

MARIA ISABEL STETS

Monitoramento de *Azospirillum brasilense* e estudo da diversidade bacteriana associada a raízes de trigo (*Triticum aestivum*)

Curitiba
2013

MARIA ISABEL STETS

Monitoramento de *Azospirillum brasilense* e estudo da diversidade bacteriana associada a raízes de trigo (*Triticum aestivum*)

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná – UFPR como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Ciências-Bioquímica.

Orientador: Leonardo Magalhães Cruz
Co-orientadora: Maria Berenice Reynaud Steffens

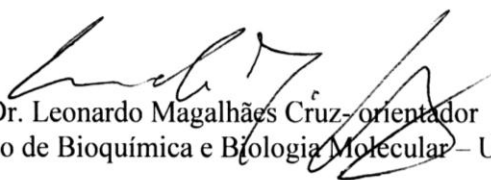
Curitiba
2013

TERMO DE APROVAÇÃO

MARIA ISABEL STETS

Monitoramento de *Azospirillum brasilense* e estudo da diversidade bacteriana associada à raízes de trigo (*Triticum aestivum*)

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências-Bioquímica no Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão Examinadora formada pelos professores:



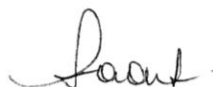
Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz-orientador
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof.ª Dr.ª Luciane Maria Pereira Passaglia
Instituto de Biociências/ Departamento de Genética – UFRGS



Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira
Departamento de Bioquímica e Biotecnologia – UEL



Prof.ª Dr.ª Cyntia Maria Telles Fadel-Picheth
Departamento de Patologia Médica – UFPR



Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Curitiba, 25 de janeiro de 2013

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Leonardo Magalhães Cruz e Maria Berenice Reynaud Steffens, por partilharem comigo seus conhecimentos, pela generosidade, confiança, atenção e paciência. Pela liberdade a mim concedida para que pudesse acrescentar análises que não constavam nas etapas do projeto;

Aos meus avaliadores, Luciano Fernandes Huergo, Rose Adele Monteiro e Emanuel Maltempi de Souza, por todas as contribuições à minha tese e incentivo;

Aos meus pais, Antônio e Emília Stets, pelo exemplo, pela educação, carinho e incentivo. À minha irmã Sandra pelo companheirismo e toda a ajuda;

Aos professores Luciane Passaglia, André Oliveira, Cyntia Fadel-Picheth e Emanuel Maltempi de Sousa por aceitarem participar de minha banca de defesa de tese;

A todos os professores do programa de Pós Graduação em Ciências Bioquímica, por estarem sempre dispostos a colaborar;

Ao professor Anton Hartmann que me recebeu muito bem em seu laboratório durante o estágio sandwich na Alemanha. Aos professores Michael Rothballer e Michael Schmid por toda ajuda durante este período. A todos os amigos que fiz por lá, que fizeram deste tempo uma etapa inesquecível em minha vida.

Aos professores Vandeir Francisco Guimarães, Cyntia Fadel-Picheth e Lucélia Donatti pela colaboração nos experimentos deste projeto;

Aos técnicos Roseli Prado, Valter Baura, Alex, Dona Marilza e Julieta Pie pela amizade, por toda a ajuda, pela paciência e pelos conhecimentos compartilhados;

À coordenação de Pós-Graduação em Bioquímica pelo trabalho constante para permitir nossa formação;

A todos os colegas de laboratório, pelo companheirismo, amizade e momentos de descontração. A ajuda de vocês foi essencial para a realização deste projeto;

Às agencias financiadoras CAPES, CNPq e INCT da Fixação Biológica de Nitrogênio, pela bolsa e suporte ao desenvolvimento do projeto.

RESUMO

O reconhecimento da importância da biologia do solo e da busca de alternativas para diminuir o consumo de fertilizantes nitrogenados ampliou as pesquisas na área de fixação biológica de nitrogênio. O efeito da bactéria *Azospirillum* sp. no desenvolvimento das plantas tem sido pesquisado, não somente quanto ao rendimento das culturas mas, também, com relação às causas fisiológicas que, possivelmente, aumentam esse rendimento. Contudo, ainda são necessários estudos sobre os efeitos da inoculação destes microrganismos na diversidade microbiana do solo e da planta. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi determinar a diversidade bacteriana associada à cultura do trigo submetido a diferentes tratamentos e inoculação com a estirpe de *Azospirillum brasilense* FP2 e monitorar a população da bactéria inoculada. Um protocolo otimizado para análise de microrganismos por espectrometria de massa MALDI-TOF foi desenvolvido. Bactérias das raízes de trigo foram isoladas e então analisadas por espectrometria de massa MALDI-TOF para agrupamento a partir do perfil de m/z obtidos. Representantes de cada grupo foram identificados por seqüenciamento do gene 16S rRNA. A análise dos grupos obtidos por espectrometria de massa mostrou que a inoculação com *A. brasilense* afetou a composição da microbiota associada à raiz, sendo a maioria das espécies identificadas nas plantas inoculadas diferentes das plantas não inoculadas. O grupo mais abundante de bactérias isoladas é do gênero *Pseudomonas* sp. A bactéria *A. brasilense* não foi recuperada entre os isolados. A metodologia para a identificação de microrganismos por espectrometria de massa MALDI-TOF desenvolvida neste trabalho é muito útil para estudos de diversidade de microrganismos isolados. A técnica de Hibridização Fluorescente *in situ* foi utilizada para observar a colonização de *A. brasilense* FP2 em condições estéreis e não estéreis em raízes de trigo. Oligonucleotídeos específicos para a estirpe de *A. brasilense* FP2 foram desenhados e um protocolo para a quantificação deste organismo por qPCR foi desenvolvido. Esta quantificação foi realizada em condições estéreis, não estéreis e sob competição com os organismos *A. brasilense* NH, *Herbaspirillum seropedicae* Z67, *Gluconacetobacter diazotrophicus* DSM 5601 e *A. lipoferum* DSM 1691, todos com concentração final de 10^7 UFC/planta. A comparação entre a quantificação da bactéria inoculada por qPCR e contagem em placa mostrou resultados similares. A contagem de *A. brasilense* FP2 inoculado não apresentou uma redução significativa indicando que esta bactéria é competitiva, mantendo uma alta contagem de células mesmo com a crescente competição imposta nos experimentos. A metodologia de qPCR desenvolvida neste trabalho é uma ferramenta muito útil no monitoramento da dinâmica da população da bactéria inoculada com potencial aplicação no campo.

Palavras-chave: Diversidade microbiana; Espectrometria de massa MALDI-TOF, FISH, qPCR.

ABSTRACT

The importance of soil biology and the search for alternatives to reduce nitrogen fertilizers consumption increased the research on biological nitrogen fixation. The *Azospirillum* sp. effect in plant development globally studied, not only considering the inoculation effect on crop yields but also about the physiological causes related to such yield increases. However, further studies are needed to clarify the inoculation effects of these microorganisms in the soil and plant microbial diversity. Thus, the objective of this study was to analyse the bacterial diversity associated with the wheat crop subjected to different treatments and inoculation with *Azospirillum brasilense* strain FP2 and monitor the population of the inoculated bacteria. An optimized MALDI-TOF mass spectrometry protocol was developed to analyze the isolated microorganisms. Bacteria from the wheat roots were isolated, analyzed by MALDI-TOF and grouped based on the m/z profile obtained. Representatives of each group were identified by 16S rRNA gene sequencing. The analysis obtained by mass spectroscopy showed that inoculation with *A. brasilense* affected the composition of the root microbiota associated and most species were different between inoculated and non inoculated plants. The most abundant bacterial group was *Pseudomonas* sp. The *Azospirillum brasilense* was not found among the isolates recovered. The methodology for the identification of microorganisms by mass spectrometry MALDI-TOF developed in this work is very useful for microbial diversity studies. The fluorescent in situ hybridization technique was used to observe the *Azospirillum brasilense* FP2 colonization in sterile and non-sterile wheat roots. Strain specific primers for *Azospirillum brasilense* FP2 were designed and a quantification protocol of this organism was developed by qPCR. Quantification was performed under sterile, non sterile conditions and under co-inoculation with the diazotrophic bacteria *A. brasilense* NH, *Herbaspirillum seropedicae* Z67, *Gluconacetobacter diazotrophicus* DSM 5601 and *A. lipoferum* DSM 1691, each bacteria with the final concentration 10^7 CFU/plant in controlled conditions. A comparison of the quantification of inoculated bacteria by qPCR and traditional plate count showed similar results. The counting of inoculated *A. brasilense* FP2 did not show a significant reduction indicating that this bacterium is competitive while maintaining a high cell count even with the growing competition imposed in the experiments. The qPCR methodology developed in this work is a very useful tool to monitor the inoculated bacterial population dynamics with potential application in the field.

Key words: Microbial diversity; MALDI-TOF mass spectrometry, FISH, qPCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 Esquema do processo de ionização por espectrometria de massa MALDI-TOF.....	19
Figura 02 Espectros de massa MALDI-TOF obtidos de uma mesma amostra utilizando células inteiras ou lisado celular de <i>A. brasilense</i> FP2	29
Figura 03 Reprodutibilidade de espectros de massa obtidos para células lisadas de <i>Azospirillum brasilense</i> FP2 por MALDI-TOF.	32
Figura 04 Espectros de massa MALDI-TOF de <i>Azospirillum brasilense</i> FP2 cultivado em diferentes meios de cultura.	34
Figura 05 Efeito da idade das células nos perfis dos espectros de massa MALDI-TOF. <i>A. brasilense</i> FP2.....	37
Figura 06 Espectros de massa MALDI-TOF das estirpes de <i>Azospirillum brasilense</i> FP2 e FP10.....	38
Figura 07 Fluxograma dos experimentos de diversidade bacteriana associada a plantas de trigo inoculado com <i>Azospirillum brasilense</i> FP2	39
Figura 08 Dendrograma dos isolados de trigo inoculado com <i>Azospirillum brasilense</i> FP2 gerados pelo programa MS-Analyser	41
Figura 09 Dendrograma dos isolados de não inoculado gerados pelo programa MS-Analyser	42
Figura 10 Dendrograma de 138 isolados de raízes de trigo inoculado e não inoculado com <i>A. brasilense</i> FP2.....	43
Figura 11 Espectros de massa MALDI-TOF obtidos de isolados de trigo identificados por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA	44
Figura 12 Dendrograma de 65 isolados baseado em sequências parciais do gene 16S rRNA.....	47
Figura 13 Perfis de espectro de massa MALDI-TOF obtidos do isolamento de diazotrofos do controle que consiste de trigo não inoculado com <i>Azospirillum brasilense</i> FP2 em meio NFbHPN malato.	49
Figura 14 Dendrograma obtido pelo programa Speclust dos diazotrofos isolados da planta inoculada, não inoculada e do <i>A. brasilense</i> FP2 crescidos em meio NFbHPN malato.....	50
Figura 15 Eletromicrografia de varredura de superfície de semente de trigo inoculado com <i>Azospirillum brasilense</i> FP2 na presença (A) ou ausência (B) de 0,5% de PVP.....	61
Figura 16 A: imagens de microscopia de fluorescência de células de <i>Azospirillum brasilense</i> FP2 com o gene <i>gfp</i>	62
Figura 17 Hibridização fluorescente <i>in situ</i> de células de <i>A. brasilense</i> FP2 e <i>A. lipoferum</i> com a sonda Abras1420, contendo os fluoróforos Cy5 (azul) e Cy3 (vermelho) e com a sonda EUB mix contendo os fluoróforos Cy5 (azul) e Cy3 (vermelho).....	64

Figura 18 Hibridização fluorescente <i>in situ</i> de raízes de trigo após 7 dias de inoculação com <i>A. brasilense</i> FP2 em condições estéreis.	65
Figura 19 Hibridização fluorescente <i>in situ</i> de raízes de trigo após 7 dias de inoculação com <i>A. brasilense</i> FP2 em condições não estéreis.	66
Figura 20 Hibridização fluorescente <i>in situ</i> de raízes de trigo não inoculadas em condições não estéreis.	67
Figura 21 Hibridização fluorescente <i>in situ</i> de raízes de trigo não inoculadas em condições estéreis	68
Figura 22 Localização de uma região selecionada (indicada em rosa) para ser alvo de oligonucleotídeos para a quantificação de <i>Azospirillum brasilense</i>	77
Figura 23 Teste de especificidade dos oligonucleotídeos desenhados na região intergênica de <i>Azospirillum brasilense</i> FP2.	79
Figura 24 O oligonucleotídeo Azo-2 usado neste estudo foi testado contra vários DNAs bacterianos:	80
Figura 25 Regiões utilizadas para o desenho de oligonucleotídeos específicos para <i>A. brasilense</i> FP2.....	81
Figura 26 Teste de especificidade de seis oligonucleotídeos desenhados para <i>A. brasilense</i> FP2.	82
Figura 27 Curva padrão de qPCR relacionada ao número de células de <i>A. brasilense</i> e o valor de Ct.	85
Figura 28 Quantificação de <i>A. brasilense</i> FP2 por qPCR em trigo inoculado em condições estéreis 1 a 13 dias após a inoculação.	86
Figura 29 Comparação da quantificação de <i>A. brasilense</i> FP2 associado á raiz de trigo pelas técnicas de qPCR e contagem em placa em condições estéreis.	87
Figura 30 Peso fresco de raízes (A) e parte aérea (B) de plantas inoculadas com <i>A. brasilense</i> FP2 e cultivadas sob condições estéreis 1 a 13 dias após a inoculação.....	88
Figura 31 Promoção de crescimento de trigo inoculado com <i>A. brasilense</i> FP2.....	89
Figura 32 Quantificação de <i>A. brasilense</i> FP2 associado ao trigo em condições não estéreis 1 a 13 dias após a inoculação	90
Figura 33 Comparação da quantificação de <i>A. brasilense</i> FP2 associado á raiz de trigo pelas técnicas de qPCR e contagem em placa em condições não estéreis ..	90
Figura 34 Quantificação de <i>A. brasilense</i> FP2 associado a trigo inoculado na presença de outras bactérias diazotróficas 1 a 13 dias após a inoculação.....	91
Figura 35 Comparação da quantificação de <i>A. brasilense</i> FP2 associado á raiz de trigo pelas técnicas de qPCR e contagem em placa na presença de outras bactérias diazotróficas	92
Figura 36 Resumo da quantificação por qPCR de <i>A. brasilense</i> FP2 inoculado em trigo nas três condições experimentais testadas neste trabalho.	93

Listas de Tabelas

Tabela 01 Comparativo de área, produtividade e produção das safras 2011/2012 e 2012/2013	16
Tabela 02 Microrganismos utilizados neste trabalho.....	22
Tabela 03 Lista dos picos em comum encontrados no efeito da concentração de células sobre a reprodutibilidade dos espectros	30
Tabela 04 Lista dos picos em comum encontrados no efeito das variações inter-análises sobre a reprodutibilidade dos espectros	33
Tabela 05 Lista dos picos em comum encontrados no efeito do meio de cultivo sobre a reprodutibilidade dos espectros	35
Tabela 06 Perfis de espectros de diazotrofos isolados de trigo em meio NFbHPN malato inoculado com <i>Azospirillum brasilense</i> FP2 e do controle	49
Tabela 07 Sondas utilizadas neste estudo para identificação de <i>Azospirillum brasilense</i> inoculado em trigo	57
Tabela 08 Efeito da desinfestação superficial e inoculação de sementes de trigo cultivar CD 150 com a bactéria <i>Azospirillum brasilense</i> FP2 contendo o plasmídeo pHRGFPGUS.....	62
Tabela 09 Oligonucleotídeos específicos para <i>Azospirillum brasilense</i>	78
Tabela 10 Oligonucleotídeos específicos para <i>Azospirillum brasilense</i> FP2 utilizados neste trabalho	82
Tabela 11 Eficiência dos oligonucleotídeos específicos para <i>A. brasilense</i> FP2	84

LISTA DE SIGLAS

ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i> (Coleção tipo de culturas bacterianas americana)
CONAB	- Companhia nacional de abastecimento
Ct	- <i>Cycle threshold</i> (Limiar do ciclo)
DEPC	- Dietil pirocarbonato
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMBRAPA	- Empresa brasileira de pesquisa agropecuária
EXO	- Exonuclease
FISH	- <i>Fluorescent in situ hybridization</i> (Hibridização fluorescente <i>in situ</i>)
MALDI-TOF	- <i>Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight</i>
NFN	- Núcleo de fixação de nitrogênio
PVP	- Polivinilpirrolidona
SAP	- Fosfatase alcalina
SDS	- Sódio dodecil sulfato
USDA	- <i>United States department of agriculture</i> (Departamento de agricultura dos Estados Unidos)
UV	- Ultra violeta
CV	- Coeficiente de variação
ppm	- Partes por milhão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVO GERAL	14
CAPÍTULO 01: IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF		15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1	Cultura do trigo.....	15
3.2	Bactérias promotoras do crescimento vegetal	16
3.3	Espectrometria de massa.....	18
4	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
5	METODOLOGIA	22
5.1	Microrganismos utilizados	22
5.2	Otimização da técnica de espectrometria de massa maldi-tof para análise de microrganismos	23
5.2.1	Preparo das amostras para análise no espectrômetro de massas MALDI-TOF.....	23
5.2.2	Análise das amostras por espectrometria de massa.....	23
5.2.3	Análise e agrupamento dos espectros	24
5.3	Determinação da diversidade bacteriana por métodos dependentes de cultivo associada à cultura do trigo	25
5.3.1	Delineamento experimental.....	25
5.3.2	Isolamento e contagem da população de bactérias	25
5.3.3	Preparo das amostras para reação da PCR a partir de culturas.....	26
5.3.4	Amplificação do gene 16S rRNA por PCR	26
5.3.5	Tratamento do produto amplificado para sequenciamento	27
5.3.6	Sequenciamento do gene 16S rRNA dos isolados	27
5.3.7	Análise das sequências.....	27
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6.1	Análise de microrganismos por espectrometria de massa MALDI-TOF....	28
6.1.1	Padronização do pré-processamento das amostras para análise no espectrômetro de massa MALDI-TOF.....	28
6.1.2	Efeito da concentração de células na reprodutibilidade dos espectros	29
6.1.3	Efeito da localização das amostras na placa de análise sobre a reprodutibilidade dos espectros.....	31
6.1.4	Efeito das variações inter-análises na reprodutibilidade dos espectros	32
6.1.5	Efeito do meio de cultivo sobre a reprodutibilidade dos espectros.....	33

6.1.6	Efeito da idade das células na reprodutibilidade dos espectros.....	36
6.1.7	Variação intra-específica dos perfis de massa MALDI-TOF.....	37
6.2	Diversidade bacteriana associada a plantas de trigo inoculado com <i>Azospirillum brasilense</i> FP2	39
6.2.1	Contagem de bactérias totais e bactérias diazotróficas	39
6.2.2	Análise dos isolados de trigo inoculado com <i>Azospirillum brasilense</i> FP2 por espectrometria de massa MALDI-TOF	40
6.2.3	Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA dos isolados	44
7	CONCLUSÕES	51
CAPÍTULO 02: OBSERVAR A COLONIZAÇÃO DE <i>Azospirillum brasilense</i> FP2 EM TRIGO UTILIZANDO AS TÉCNICAS DE FISH E MARCAÇÃO COM O GENE REPÓRTER <i>gfp</i>		52
8	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	52
8.1	Hibridização <i>in situ</i> com oligonucleotídeos fluorescentes (FISH).....	52
9	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
10	MATERIAIS E MÉTODOS	54
10.1	Testes de viabilidade da semente e do inóculo com <i>Azospirillum brasilense</i> FP2.....	54
10.1.1	Preparo de inoculante líquido a partir de culturas de <i>Azospirillum brasilense</i> FP2.....	54
10.1.2	Desinfestação das sementes	54
10.1.3	Inoculação das sementes de trigo.....	54
10.1.4	Efeito da desinfestação da semente	55
10.1.5	Efeito da adição de polivinilpirrolidona (PVP) ao inóculo contendo <i>A. brasilense</i> FP2	55
10.2	Hibridização fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	56
10.2.1	Cultura pura	56
10.2.2	Raízes	57
10.3	Monitoramento da colonização de plantas com <i>Azospirillum brasilense</i> FP2 utilizando estirpes marcadas com o gene repórter <i>gfp</i>	58
10.3.1	Marcação da estirpe de <i>Azospirillum brasilense</i> com o gene repórter <i>gfp</i> ...	58
10.3.2	Efeito da inoculação de sementes de trigo com a bactéria <i>A. brasilense</i> FP2 marcada com o gene <i>gfp</i>	58
10.3.3	Contagem da população de bactérias associadas ao trigo	59
10.3.4	Análises dos dados obtidos.....	59
11	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
11.1	Inoculação de trigo com <i>Azospirillum brasilense</i> FP2	60
11.1.1	Efeito da desinfestação da semente	60

11.1.2	Efeito da adição de polivinilpirrolidona (PVP) ao inoculante contendo <i>A. brasilense</i> FP2	60
11.1.3	Efeito da inoculação de sementes de trigo cultivar CD150 com a bactéria <i>A. brasilense</i> FP2 marcado com <i>gfp</i>	61
11.2	Hibridização fluorescente <i>in situ</i>	63
12	CONCLUSÕES	69
CAPÍTULO 03: MONITORAMENTO DE <i>Azospirillum brasilense</i> FP2 INOCULADO EM TRIGO UTILIZANDO qPCR		70
13	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	70
13.1	Quantificação de microrganismos em amostras ambientais utilizando PCR quantitativa (qPCR)	70
14	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	72
15	MATERIAIS E MÉTODOS	73
15.1	Desenho de oligonucleotídeos iniciadores para quantificação e monitoramento da estirpe inoculada por qPCR.....	73
15.2	Inoculação de trigo com <i>Azospirillum brasilense</i> FP2 sob condições de casa de vegetação	73
15.3	Coleta das amostras e análises	74
15.4	Extração de DNA.....	74
15.5	PCR quantitativo (qPCR)	74
15.6	Curva de calibração de DNA.....	76
15.7	Análises dos dados	76
16	RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
16.1	Desenho de oligonucleotídeos iniciadores e avaliação da eficiência de amplificação	77
16.2	Quantificação de <i>A. brasilense</i> FP2 colonizando raízes de trigo em condições estéreis.....	85
16.3	Quantificação de <i>A. brasilense</i> FP2 associado a trigo cultivado sob condições não estéreis.....	89
16.4	Quantificação de <i>A. brasilense</i> FP2 associado a trigo cultivado sob condições não estéreis e na presença de outras bactérias diazotróficas.....	91
17	CONCLUSÕES	94
18	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

1 INTRODUÇÃO

O trigo ocupa o segundo lugar mundial em quantidade de grãos produzidos. No Brasil, a produção anual oscila entre 5 e 6 milhões de toneladas. É cultivado nas regiões Sul (RS, SC e PR), Sudeste (MG e SP) e Centro-oeste (MS, GO e DF). O consumo anual no país tem se mantido em torno de 10 milhões de toneladas. Cerca de 94% da produção de trigo está no Sul do Brasil. O cereal vem sendo introduzido paulatinamente na região do cerrado, sob irrigação ou sequeiro (EMBRAPA, 2005).

Paralelamente ao aumento da produção, observa-se o aumento dos custos econômicos e ambientais relacionados à fertilização nitrogenada. Desta forma, a cultura da cana-de-açúcar, do trigo e do milho podem beneficiar-se da inoculação de bactérias diazotróficas capazes de fixar nitrogênio atmosférico (N_2) e/ou produzir substâncias promotoras de crescimento (RONCATO-MACCARI et al., 2003; DOBBELARAERE e OKON, 2007).

Vários experimentos de inoculação destas gramíneas têm sido conduzidos sob condições controladas de casa de vegetação e de campo, utilizando diferentes gêneros de bactérias diazotróficas, demonstrando a contribuição para o desenvolvimento vegetal (BALDANI e BALDANI, 2005). Dentre estas bactérias estão *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*. Estudos sobre a regulação da fixação de nitrogênio na estirpe FP2 de *Azospirillum brasilense* levaram ao isolamento de mutantes espontâneos, resistentes a etilenodiamina (EDAR), que fixam nitrogênio constitutivamente em presença de NH_4^+ e excretam o NH_4^+ derivado da fixação de nitrogênio (MACHADO et al., 1991).

A descoberta destes mutantes abriu a perspectiva de sua aplicação para incrementar o suprimento de nitrogênio fixado para a planta hospedeira e justifica a importância da investigação do comportamento e contribuição destes mutantes no desenvolvimento vegetal e na captação do nitrogênio pelas plantas. Por outro lado, existe uma carência de trabalhos com o uso de técnicas adequadas que quantifiquem a contribuição do processo de Fixação Biológica de Nitrogênio nas diversas culturas de plantas nas condições de campo, principalmente em culturas não leguminosas. Nestas áreas, o manejo dado a cultura é, em muitos casos, diferente das condições experimentais o que pode alterar a eficiência do processo de Fixação Biológica de Nitrogênio (POLIDORO et al., 2001). Além disso, o uso de plantas micropropagadas e a condução de experimentos em casa de vegetação,

normalmente utilizando substrato estéril, não levam em conta o fator diversidade microbiana do solo local e como esta pode afetar a capacidade da bactéria inoculada colonizar e manter sua população estável nas plantas hospedeiras (MAGNANI, 2005).

Poucos estudos foram realizados para avaliar o impacto da agricultura na diversidade microbiana nativa, incluindo a população de bactérias de solo e endofíticas de plantas cultivadas em diferentes agroecossistemas brasileiros. Como a diversidade e ecologia microbiana de bactérias endofíticas associadas com plantas têm sido pouco estudadas, somente uma pequena fração da comunidade microbiana tem sido conhecida e explorada (BALDANI et al., 1997). Técnicas microbiológicas e moleculares, dependentes e independentes de cultivo foram utilizadas neste trabalho para caracterizar a diversidade genética das bactérias associadas à cultura do trigo e a estabilidade populacional das bactérias inoculadas ao longo do desenvolvimento destas plantas.

1 OBJETIVO GERAL

Monitorar a população de *Azospirillum brasilense* FP2 e determinar a diversidade bacteriana associada à cultura do trigo submetido a diferentes tratamentos e inoculação com a estirpe de *Azospirillum brasilense* FP2.

CAPÍTULO 01: IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cultura do trigo

O trigo é uma cultura adaptada a diversos locais graças ao seu complexo genoma que proporciona alta plasticidade (ACEVEDO et al., 2002). Essa cultura tem grande importância no cenário agrícola mundial, por ser o cereal mais cultivado em área e é superado apenas pelo milho na quantidade de grãos produzidos (USDA, 2009). Assim, estudos levando ao melhoramento e aumento da produção dessa cultura podem aumentar a disponibilidade e acesso deste grão a um considerável número de pessoas.

O ciclo de desenvolvimento da cultura de trigo pode ser dividido em três fases principais, que ocorrem em sequência: vegetativa, reprodutiva e de enchimento de grãos. Conforme Slafer e Rawson (1994), a fase vegetativa estende-se da sementeira, envolvendo germinação de sementes e emergência de plantas, até o estágio de duplo-anel, e compreende etapa em que, no ponto de crescimento são diferenciadas somente estruturas foliares. Por sua vez, na fase reprodutiva, que engloba o período que vai do estágio de duplo anel até a antese (floração), ocorre a diferenciação de estruturas florais e o número de flores férteis (virtualmente número de grãos) é determinado. Por último, a fase de enchimento de grãos, que vai da antese até a maturação fisiológica, define a massa final de cada grão.

A estimativa de safra da Conab realizada em dezembro de 2012 apontou para uma produção de trigo de 4.300,4 mil toneladas contra 5.788,6 mil de toneladas, em 2011/12, representando uma redução de 25,7%, da ordem de 1.488,2 mil toneladas, em função do recuo da produtividade da cultura no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina, devido a problemas climáticos. No Brasil, a produtividade recuou de 2.672 kg em 2011/12, para 2.269 kg por hectares atuais. Na região Sul caiu de 2.671 kg para 2.240 kg por hectares e no Rio Grande do Sul, recuou 36,7%, de 2.941 kg para 1.860 kg por hectare. A safra atual se caracterizou pela instabilidade climática devido ao fenômeno *El Niño*, com excessivas chuvas no período crítico da cultura, após temporada de pouca umidade na época do plantio. Essa ocorrência tirou do Rio Grande do Sul a posição de maior produtor nacional conquistada na safra

2011/12. A colheita da Região Sul equivale a 94,6% da brasileira e o Estado do Paraná, menos afetado pelo clima adverso, é responsável por 2,1 milhões de toneladas, superior a do Rio Grande do Sul que foi reduzida para 1,8 milhão de toneladas. Pelos mesmos motivos, Santa Catarina perde 39,9% de sua safra ficando com 141,6 milhões de toneladas (Conab, 2011).

Tabela 01 Comparativo de área, produtividade e produção das safras 2011/2012 e 2012/2013

REGIÃO/UF	ÁREA (Em mil ha)			PRODUTIVIDADE (Em kg/ha)			PRODUÇÃO (Em mil t)		
	Safra 11/12 (a)	Safra 12/13 (b)	VAR. % (b/a)	Safra 11/12 (c)	Safra 12/13 (d)	VAR. % (d/c)	Safra 11/12 (e)	Safra 12/13 (f)	VAR. % (f/e)
CENTRO-OESTE	45,3	24,8	(45,3)	2.406	2.750	14,3	109,0	68,2	(37,4)
MS	32,0	15,0	(53,1)	1.340	1.600	19,4	42,9	24,0	(44,1)
GO	12,2	9,0	(26,0)	4.949	4.400	(11,1)	60,4	39,6	(34,4)
DF	1,1	0,8	(27,3)	5.200	5.700	9,6	5,7	4,6	(19,3)
SUDESTE	70,0	53,5	(23,6)	2.869	3.036	5,8	200,8	162,4	(19,1)
MG	23,0	21,5	(6,5)	3.917	3.753	(4,2)	90,1	80,7	(10,4)
SP	47,0	32,0	(31,9)	2.355	2.553	8,4	110,7	81,7	(26,2)
SUL	2.050,9	1.817,1	(11,4)	2.671	2.240	(16,1)	5.478,8	4.069,8	(25,7)
PR	1.042,5	773,8	(25,8)	2.399	2.730	13,8	2.501,0	2.112,5	(15,5)
SC	76,0	67,1	(11,7)	3.100	2.110	(31,9)	235,6	141,6	(39,9)
RS	932,4	976,2	4,7	2.941	1.860	(36,8)	2.742,2	1.815,7	(33,8)
CENTRO-SUL	2.166,2	1.895,4	(12,5)	2.672	2.269	(15,1)	5.788,6	4.300,4	(25,7)
BRASIL	2.166,2	1.895,4	(12,5)	2.672	2.269	(15,1)	5.788,6	4.300,4	(25,7)

FONTE: CONAB - Levantamento: Janeiro/2013.

2.2 Bactérias promotoras do crescimento vegetal

As bactérias do solo que são benéficas para o crescimento de plantas são geralmente referidas como rizobactérias promotoras do crescimento vegetal, capazes de colonizar as raízes e promover o crescimento das plantas (GHOLAMI et al., 2009). A promoção do crescimento vegetal se dá principalmente pela produção pelas bactérias endofíticas de fitormônios como as auxinas, citocininas, giberelinas e regulação da produção de ácido abscísico e etileno e já foi relatada em bactérias como *Gluconoacetobacter*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Erwinia*, *Azotobacter*, *Pantoea* e *Pseudomonas* (LEE, 2004; ZAKHAROVA, 2003; NARULA et al., 2006; KUKLINSKY-SOBRA, 2004). O ácido indol acético é uma auxina importante de ocorrência natural que possui efeitos no desenvolvimento das raízes e partes aérea das plantas (TIEN, GASKINS e HUBBELL, 1979).

Dentre este grupo de bactérias, estirpes de *Azospirillum* têm sido bem reconhecidas como biofertilizante devido à sua capacidade de promoção de

crescimento vegetal tais como fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato, e a produção de fitormônios e de substâncias reguladoras ou sideróforos (CREUS et al., 2005; BASHAN, HOLGUIN e De-BASHAN, 2004; HARTMANN e BALDANI 2003; SAXENA, MODI e MODI 1986; SESHADRI et al., 2000; STEENHOUDT e VANDERLEYDEN 2000; THULER et al., 2003; TIEN et al., 1979). A inoculação com estirpes de *Azospirillum brasilense* já foi testada e se mostrou efetiva em diversas culturas como milho, trigo e tomate (BASHAN et al., 1991; BASHAN e De-BASHAN, 2002; HUNGRIA et al., 2010).

Azospirillum é o gênero melhor caracterizado de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000). Outros diazotrofos freqüentemente encontrados em parceria com plantas incluem *Gluconacetobacter diazotrophicus* (JAMES et al., 1994), *Herbaspirillum seropedicae* (RONCATO-MACCARI et al., 2003), *Azoarcus* sp. (ENGELHARD et al., 2000) e *Azotobacter* (MARTINEZ-TOLEDO e GONZALEZ-LOPEZ, 1988). Quatro aspectos da interação entre as raízes das plantas e o *Azospirillum* são destacados: é encontrado naturalmente em interação com a raiz da planta, fixação de nitrogênio e biossíntese de hormônios promotores de crescimento. O gênero *Azospirillum* é composto predominantemente por espécies colonizadoras da superfície, ao passo que *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae* e *Azoarcus* sp. são diazotrofos endofíticos (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000).

Cavallet et al., (2000) demonstraram a eficiência de bactérias diazotróficas em associação com gramíneas e propuseram o uso de um produto comercial a base de *Azospirillum* sp. A produtividade de grãos de milho foi aumentada de 5.211 kg ha⁻¹ para 6.067 kg ha⁻¹, ou seja, aumento de 17% e o comprimento médio das espigas foi de 13,6 para 14,4 cm, aumento de 6%, sem alterar a altura da planta nem o número de fileiras de grãos por espiga. A aplicação de nitrogênio na semeadura e/ou em cobertura, não causou efeito sobre a produtividade do milho.

A diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas, varia nos estágios de desenvolvimento e nas diferentes partes da planta. Barraquio et al., (1997), ao estudar as variedades de arroz irrigado, observaram que o número de bactérias diazotróficas endofíticas em raízes e colmos contadas pela técnica do número mais provável (NMP), variou nos diferentes estágios de desenvolvimento, tendo atingido máximo no florescimento. Engerlhard et al., (2000) constataram que a diversidade

de estirpes de *Azoarcus* pela análise de sequências do gene 16S rRNA, foi significativamente menor em espécies de arroz selvagem, do que em variedades melhoradas geneticamente. Rodrigues et al., (2006) estudando a diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado utilizando a técnica de contagem da população bacteriana pelo número mais provável (NMP) concluíram que as populações de bactérias diazotróficas oscilam durante o desenvolvimento das variedades de arroz e o número de bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Burkholderia* é maior do que do gênero *Herbaspirillum* nas duas variedades utilizadas. Esses resultados sugerem que a diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas parece estar condicionada à espécie vegetal. A avaliação da diversidade de bactérias diazotróficas presentes nos tecidos, nos diferentes estágios de desenvolvimento da planta, pode ajudar a compreender o papel desses microrganismos em seu habitat natural.

2.3 Espectrometria de massa

A determinação da massa de biomoléculas pela técnica MALDI-TOF foi introduzida em 1987-1988 por Karas e colaboradores (KARAS et al., 1987; KARAS e HILLENKAMP, 1988). Tanaka e colaboradores (TANAKA et al., 1988) reportaram a dessorção por laser UV de compostos bio-orgânicos com massa em torno de 10 kDa pela primeira vez. A dessorção de biomoléculas não voláteis é feita tipicamente com a mistura da amostra com um composto orgânico que age como uma matriz (protonado em pH ácido) que facilita a dessorção e ionização dos compostos na amostra. Quando atingida por um laser os íons do analito são então acelerados pela aplicação de uma alta voltagem (15-25 kV), separados em um tubo de vôo livre e detectados como um sinal elétrico no final do tubo (Figura 01).

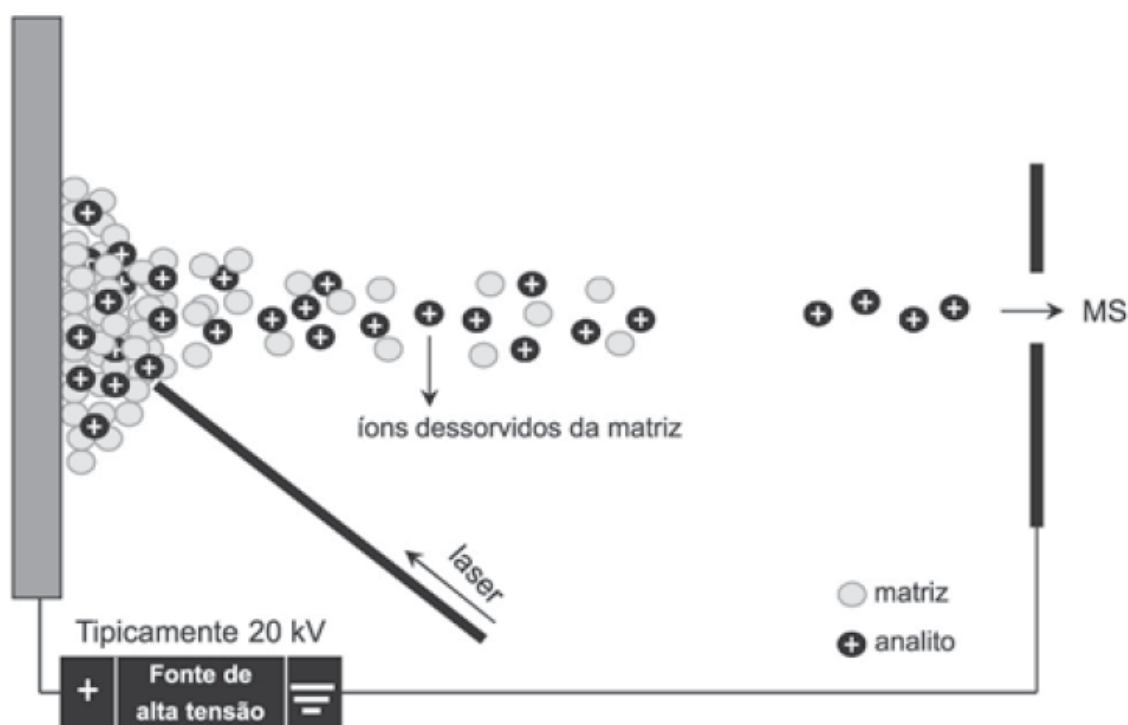


Figura 01 Esquema do processo de ionização por espectrometria de massa MALDI-TOF. Fonte: CANTU et al., 2008.

Em 1996, Holland e colaboradores descreveram pela primeira vez o uso de MALDI-TOF para análise de células microbianas intactas (HOLLAND et al., 1996), com Claydon e colaboradores concorrentemente reportando que os espectros resultantes eram convenientes para o uso na identificação de microrganismos (CLAYDON et al., 1996).

O número de vantagens da espectrometria de massa para a identificação de microrganismos é grande. A capacidade da espectrometria de massas em identificar organismos não é restrita a marcadores pré-estabelecidos, ao passo que a maior parte de outras tecnologias de detecção moleculares deve confiar em eventos de reconhecimento moleculares por anticorpos ou por oligonucleotídeos iniciadores de DNA que devem se ligar a fragmentos específicos pré determinados. Em segundo lugar, a espectrometria de massas é rápida: um experimento típico de coleta de amostra, preparação e resultado final pode ser concluído em alguns minutos. Ao contrário, dias são necessários quando se utilizam métodos de microbiologia clássicos. Em terceiro lugar, a espectrometria de massas é sensível: um sinal detectável pode ser gerado de uma amostra que contém menos de 10^4 células

(DEMIREV e FENSELAU, 2008; RAJAKARUNA et al., 2009). Finalmente, a espectrometria de massa juntamente com a cromatografia e a bioinformática é a tecnologia analítica que mais rapidamente cresce na era pós-genômica, fornecendo avanços globais rápidos em proteômica (DEMIREV e FENSELAU, 2008).

A técnica MALDI-TOF tem sido usada para identificar células bacterianas de dois modos: pela análise dos extratos de proteínas e de células intactas (EVASON et al., 2001). Contudo, diferentes trabalhos reportam o emprego de vários modos para processar a amostra para análise por MALDI-TOF. É necessário estabelecer um método universal de preparo de amostra de microrganismos para facilitar a uniformidade dos resultados entre os laboratórios de análise. Uma técnica universal deve ser reprodutível e fornecer um espectro com muitos picos para construção de um banco de dados que contenha os perfis característicos de várias bactérias e forneça uma busca rápida e exata (LIU et al., 2007).

Três métodos envolvendo espectrometria de massa MALDI-TOF e caracterização bacteriana foram desenvolvidos: i) um consiste na detecção de proteínas biomarcadoras específicas indicativas de genótipo específico ou propriedades fenotípicas; ii) o segundo utiliza busca em banco de dados de proteína para agrupar ou identificar microrganismos; iii) e o terceiro emprega comparações espectrais para identificar espécies ou estirpes. Enquanto todas estas ferramentas necessitam certo nível de reprodutibilidade, a comparação de espectros de referência e desconhecidos para identificação bacteriana necessita de um nível mais alto de reprodutibilidade entre espectros (WILLIAMS et al., 2003).

A capacidade da espectrometria de massa MALDI-TOF em caracterizar rapidamente microrganismos tem aplicações potenciais para um grande número de áreas como a medicina diagnóstica, biossegurança, monitoramento ambiental, agricultura, controle de qualidade de alimentos, segurança ocupacional e caracterização de coleções de microrganismos (DEMIREV e FENSELAU, 2008).

Contudo, esta técnica ainda possui algumas limitações tais como baixa cobertura de bancos de dados, variações entre instrumentos, diferentes protocolos e, em alguns casos, não diferenciação entre estirpes. Porém, com o desenvolvimento de pesquisas nesta área, será possível analisar e comparar dados obtidos em condições diferentes (WUNSCHHEL et al., 2005).

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Otimizar a técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF para caracterização de micorganismos;
- b) Determinar a diversidade bacteriana por métodos dependentes de cultivo associada à cultura do trigo inoculado com *Azospirillum brasilense* FP2.

4 METODOLOGIA

4.1 Microrganismos utilizados

A estirpe utilizada como inoculante nos experimentos foi o *Azospirillum brasilense* FP2, mutante espontâneo da estirpe Sp7 (ATCC 29145), resistente a estreptomicina e ácido nalidíxico e capaz de fixar nitrogênio (Nif⁺) (Pedrosa e Yates, 1984). Para os experimentos em campo, o inoculante foi preparado pela Dr^a Luiza Maria de Araújo do Núcleo de Fixação de Nitrogênio do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR. Outros organismos foram utilizados como controle nos experimentos e são listados na Tabela 02.

Tabela 02 Microrganismos utilizados neste trabalho

Organismo	Refêrencia
<i>Azospirillum brasilense</i> FP2	Pedrosa e Yates, 1984
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1	Souza et al., 2000
<i>Escherichia coli</i> S17.1	Schäfer et al., 1994
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z67	Baldani et al., 1986
<i>Herbaspirillum huttiense</i> IAM 15032	Dobritsa et al., 2010
<i>Herbaspirillum hiltneri</i> HILTI	Rothballer et al., 2006
<i>Azospirillum brasilense</i> SP245	Coleção de culturas do Helmholtz Zentrum
<i>Azospirillum brasilense</i> SP7	Coleção de culturas do Helmholtz Zentrum
<i>Azospirillum lipoferum</i> DSM1691	Coleção de culturas do Helmholtz Zentrum
<i>Azospirillum rugosum</i> DSM19657	Coleção de culturas do Helmholtz Zentrum
<i>Azospirillum irakiense</i> DSM11586a	Coleção de culturas do Helmholtz Zentrum
<i>Azospirillum amazonense</i> DSM2787	Coleção de culturas do Helmholtz Zentrum
<i>Roseomonas genomospecies</i> 6 ccuG33010	Coleção de culturas do Helmholtz Zentrum
<i>Roseomonas fauriae</i> KAcc11694	Coleção de culturas do Helmholtz Zentrum
<i>Azospirillum canadense</i> LMG23617	Coleção de culturas do Helmholtz Zentrum
<i>Burkholderia tropica</i> PPE5	Coleção de culturas do Helmholtz Zentrum
<i>Burkholderia brasiliensis</i> M171	Coleção de culturas do Helmholtz Zentrum
<i>Azospirillum brasilense</i> NH	Coleção de culturas do Helmholtz Zentrum
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> DSM 5601	Coleção de culturas do Helmholtz Zentrum
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> SEMIA 586	Coleção SEMIA ¹
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> SEMIA 5032	Coleção SEMIA ¹

<i>Bradyrhizobium elkanii</i> SEMIA 5019	Coleção SEMIA ¹
<i>Azospirillum brasilense</i> SF9	Coleção de culturas do NFN ² da UFPR
<i>Azospirillum brasilense</i> FP0	Coleção de culturas do NFN ² da UFPR
<i>Azospirillum brasilense</i> IC26	Coleção de culturas do NFN ² da UFPR

¹Rhizobium Culture Collection da Seção de Microbiologia Agrícola; Catálogo do IBP World Catalogue of Rhizobium Collections no. 443 na WFCC World Data Center on Microorganisms.

²NFN – Núcleo de Fixação de Nitrogênio

4.2 Otimização da técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF para análise de microrganismos

4.2.1 Preparo das amostras para análise no espectrômetro de massas MALDI-TOF

Células de uma colônia bacteriana de aproximadamente 3 mm de diâmetro foram suspensas em 1 mL de água esterilizada, centrifugadas a 12.000 *g* por 10 minutos e o sobrenadante descartado, este processo foi repetido uma vez, restando somente o precipitado de células. O precipitado foi ressuspenso em 10 µL de ácido fórmico 70% e 10 µL de acetonitrila e misturado várias vezes. A solução foi centrifugada a 12.000*g* por 10 minutos. O sobrenadante (~10 µL) foi transferido para uma placa de 96 poços imediatamente. Um microlitro do sobrenadante foi colocado na placa para análise no espectrômetro de massa e deixado secar à temperatura ambiente. Em seguida, 1 µL da matriz (solução saturada contendo aproximadamente 10 mg/mL de α-ciano-4-ácido hidroxicinâmico em acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 2,5%) foi depositado sobre a amostra e esperou-se a secagem à temperatura ambiente (Protocolo modificado de SAUER et al., 2008). Alternativamente, a colônia foi colocada diretamente sobre a placa para análise no espectrômetro de massa, seca à temperatura ambiente e então 1 µL da matriz foi adicionado sobre a amostra e esperou-se a secagem à temperatura ambiente.

4.2.2 Análise das amostras por espectrometria de massa

As amostras foram processadas em espectrômetro de massa MALDI-TOF (Autoflex; Bruker Daltonics) equipado com um laser de nitrogênio, utilizando o programa Flex Control v. 3.0 (Bruker Daltonics). Os íons positivos foram extraídos usando uma voltagem de aceleração de 20 kV no modo linear. Cada espectro resultou da soma dos íons obtidos de 1.000 pulsos do laser com etapas de 100

pulsos em diferentes pontos da amostra. A aquisição dos espectros foi realizada de forma manual ou automática e os espectros foram analisados em uma faixa de relação massa/carga (m/z) de 3.000 a 12.000. Para a calibração externa foi utilizado o *kit Protein Calibration Standard I* (Bruker Daltonics) contendo uma mistura de insulina (5.734,51 m/z), ubiquitina I (8.565,76 m/z) e citocromo C (12.360,97 m/z). Uma colônia de *Escherichia coli* estirpe BL21 foi analisada conjuntamente em um ponto da placa a fim de obter um grupo externo para as análises posteriores de agrupamento. Os espectros obtidos foram processados pelo programa Flex Analysis v. 3.0 (Bruker Daltonics) utilizando o modo centróide, altura de 80%, picos com 0,1 de relação m/z , linha de base subtraída e alisamento dos picos. A presença ou ausência de picos foi considerada como um padrão específico de um isolado particular. A fim de se verificar a reprodutibilidade dos espectros, amostras foram aplicadas em 8 pontos diferentes na placa e a aquisição dos espectros procedeu-se como descrito acima.

4.2.3 Análise e agrupamento dos espectros

Os perfis foram agrupados e analisados utilizando o programa *Speclust online*, disponível no portal <http://bioinfo.thep.lu.se/speclust.html> e o programa *MS-Analyser* (<http://evento2012.x-meeting.com/files/AbstractBook/info/168.html>). Este programa foi desenvolvido por Alm e colaboradores (2006) para detecção e identificação de isoformas de proteínas. Nela, as listas de picos obtidas dos espectros de cada microrganismo são comparadas entre si gerando matrizes de presença/ausência de picos, a partir destas matrizes são calculadas as distâncias entre cada microrganismo. Finalmente, os microrganismos são agrupados usando estas distâncias como ponto de partida. O resultado do agrupamento é apresentado como um dendrograma.

Foi utilizada a “distância liberal”, que é calculada como $d = 1 - S/\text{mínimo}(N, N')$, onde S: score de similaridade; N: número de picos do primeiro espectro; N': número de picos do segundo espectro. Esta medida de distância equivale à fração de picos da menor lista de picos que não apresenta nenhum pico pareado na maior lista. Para calcular a distância entre os grupos formados que possuem picos em comum foi utilizado o método da média que considera que as distâncias de dois grupos (que foram fundidos no primeiro agrupamento) em relação a outro grupo são

d e d'. A distância da ligação média entre os grupos é calculada como $D = (n \times d + n' \times d') / (n + n')$, onde n e n' correspondem ao número de microrganismos nos dois grupos (Alm et al., 2006).

Para calcular a margem de erro tolerável para se considerar que duas listas de picos são iguais, submeteu-se ao programa Speclust listas de picos do mesmo organismo e esta margem de erro foi modificada empiricamente até que as amostras formassem um único grupo. A margem de erro tolerável encontrada foi de 8 Da.

4.3 Determinação da diversidade bacteriana por métodos dependentes de cultivo associada à cultura do trigo

4.3.1 Delineamento experimental

Este experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação em solo não estéril, na Estação de Horticultura e Cultivo Protegido “Prof. Dr. Mário César Lopes”, pertencente ao Núcleo de estações experimentais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Campus de Marechal Cândido Rondon – PR, sob supervisão do professor Dr. Vandeir Guimarães. A estação está localizada a uma longitude de 54° 22' W, latitude 24° 46' S e altitude média de 420 metros. Utilizou-se a cultivar de trigo BRS208 inoculada com a estirpe *Azospirillum brasilense* FP2, sementes não inoculadas foram incluídas como controle. O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso, cada parcela experimental foi formada por um vaso (volume de 10 L). A correção do solo (calagem e adubação) foi realizada baseando-se na análise química do solo. Foram semeadas dez sementes por vaso a uma profundidade de 3,0 cm e mantidas quatro plantas por vaso após a germinação. O controle de pragas e a irrigação foram realizados de acordo com as necessidades da cultura. As plantas foram colhidas aos 13 dias após a emergência (DAE), transportadas e mantidas sob refrigeração até análise quanto à composição da microbiota bacteriana associada.

4.3.2 Isolamento e contagem da população de bactérias

Inicialmente, o excesso de solo aderido às plantas foi retirado e as plantas lavadas em água corrente e secas em papel toalha. As raízes foram separadas,

pesadas e colocadas em solução salina, na proporção 1:10 (p/v). Em seguida as raízes em solução salina foram trituradas em almofariz, mantidas em repouso à temperatura ambiente por, no mínimo, 1h e diluídas serialmente até uma diluição de 10^{-8} . As diluições 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} e 10^{-8} foram transferidas para meio JNFb (DÖBEREINER, ANDRADE e BALDANI, 1999) semi-sólido livre de nitrogênio em triplicata (plantas não inoculadas) e em quintuplicata (plantas inoculadas) e incubadas a 30°C. O crescimento de bactérias foi avaliado após 5 dias de incubação, observando-se a formação de película e /ou mudança na cor do meio dada pelo indicador de pH (azul de bromotimol). Utilizou-se a tabela de McCrady (DÖBEREINER et al., 1995) para determinar o número mais provável (NMP) das bactérias potencialmente diazotróficas e as maiores diluições onde foi observado crescimento foram plaqueadas em meio NFbHPN (DÖBEREINER, 1980) sólido utilizando malato como fonte de carbono. As diluições 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} e 10^{-8} foram também plaqueadas em meio Agar batata (HiMedia Inc) acrescido do antifúngico Azoxistrobina (Syngenta) na concentração de 80 µg/mL de meio de cultura e incubadas a 30°C por 48h.

A análise dos microrganismos isolados por espectrometria de massa MALDI-TOF foi realizada seguindo o protocolo descrito nas seções 4.2.1 a 4.2.3.

4.3.3 Preparo das amostras para reação da PCR a partir de culturas

Culturas dos isolados foram diluídas 1:10, fervidas e imediatamente resfriadas em gelo. Após este tratamento, as amostras foram usadas para reação de amplificação por PCR.

4.3.4 Amplificação do gene 16S rRNA por PCR

Alíquotas das culturas fervidas foram utilizadas como molde nas reações de amplificação. O sistema continha 1 µL de tampão da Taq polimerase 10x (Invitrogen Inc.) com $MgCl_2$ 20 mM, 0,5 µL de dNTP 4 mmol.L⁻¹, 3 pmol dos oligonucleotídeos iniciadores 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG e 1492R 5'-ACGGCTACCTTGTACGACTT (LANE, 1991), 1U Taq DNA polimerase (Invitrogen Inc.) e água ultra pura (MilliQ) para completar 10 µL. O programa utilizado no termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf) consistiu de 1 ciclo de 94°C por 2 minutos seguido de 30 ciclos de desnaturação (94°C), anelamento (55°C) e

extensão (72°C). Ao final, foi acrescentada uma etapa à 72°C por 10 minutos para garantir a completa extensão do DNA. Após a reação de amplificação, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%, coradas com brometo de etídeo e fotografadas sob luz UV.

4.3.5 Tratamento do produto amplificado para sequenciamento

O produto da amplificação foi tratado com o uso da reação enzimática simultânea de Exonuclease I (EXO I, Fermentas) e Fosfatase Alcalina (SAP, Fermentas) utilizando 5,2 e 0,77 U, respectivamente, para 23 µL do sistema da PCR. A reação foi incubada durante 1 h e 30 min a 37°C, seguido de inativação das enzimas a 80°C por 30 minutos.

4.3.6 Sequenciamento do gene 16S rRNA dos isolados

O sequenciamento foi realizado a partir de 3 µL da reação de PCR tratada com as enzimas ExoI/SAP utilizando o oligonucleotídeo iniciador 27F (5 pmol), 1 µL de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit e água ultra pura (MilliQ) estéril para completar 10 µL de reação. Ao término da reação de sequenciamento, os produtos foram precipitados pela adição de 2,5 µL de acetato de amônio (7,5 mol/L), 60 µL de etanol absoluto (Merck), 10 µL de água ultra pura (MilliQ) estéril e centrifugados por 45 minutos a 13.500 rpm. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 150 µL de etanol 80% e centrifugado novamente por 45 min a 13.500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco em estufa a 37°C.

4.3.7 Análise das sequências

A sequência obtida de cada isolado foi comparada com o banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e *Ribosomal Database Project II* (RDP II) (<http://www.rdp.cme.msu.edu>) utilizando a ferramenta RDP *classifier* visando à obtenção da classificação taxonômica.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise de microrganismos por espectrometria de massa MALDI-TOF

Para a análise de microrganismos isolados de plantas por espectrometria de massa MALDI-TOF foi necessária a padronização desta técnica. Foram analisados o tipo de pré-processamento das amostras, os efeitos da localização das amostras na placa de análise e do meio de cultivo na reprodutibilidade dos espectros, bem como o efeito da variação intra-específica na análise.

5.1.1 Padronização do pré-processamento das amostras para análise no espectrômetro de massa MALDI-TOF

Variações nos perfis de massa MALDI-TOF podem ser observadas em função do pré-tratamento das células. Duas metodologias foram avaliadas para a obtenção dos perfis de massa. Na primeira, células intactas foram colocadas diretamente na placa e procederam-se as análises no espectrômetro de massa como descrito no item 5.2 dos Materiais e Métodos. Na segunda metodologia testada, o mesmo microrganismo foi submetido ao tratamento por lise celular descrito na seção 5.2.1 de Materiais e Métodos. A Figura 02 mostra os espectros obtidos após pré-tratamento das células com as duas metodologias (célula intacta e lisado celular). A comparação dos espectros obtidos indicou que o perfil do lisado celular apresentou mais picos e, de forma geral, maior intensidade por pico quando comparado com aquela para o perfil da célula inteira, deste modo, o pré-processamento de lise celular foi utilizado em todas as demais análises.

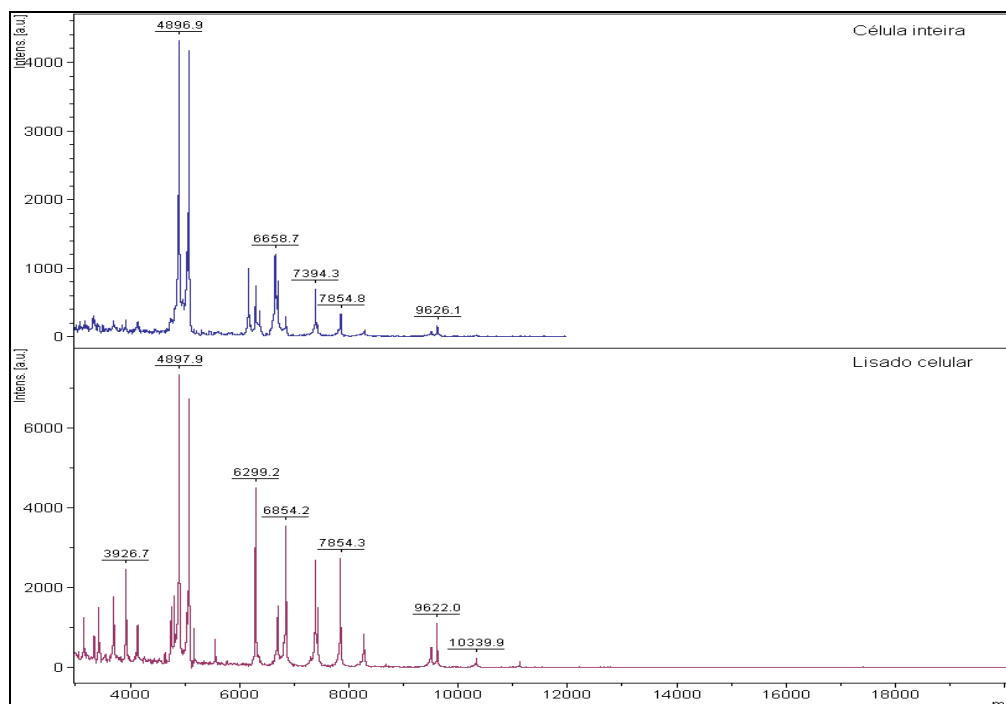


Figura 02 Espectros de massa MALDI-TOF obtidos de uma mesma cultura bacteriana utilizando os métodos de células inteiras ou lisado celular de *A. brasilense* FP2

A detecção de proteínas em lisados celulares pode fornecer potencialmente muito mais informações do que seria esperada da análise de células inteiras porque o número de proteínas detectadas em células inteiras é menor quando comparado com os espectros obtidos pelas células fracionadas (LAY JR, 2000; EVASON, 2001). Contudo, se o nível de caracterização desejado pode ser obtido utilizando um número menor de picos, este método tem a vantagem de ser mais simples e muito mais rápido. A velocidade com que os espectros de MALDI-TOF podem ser obtidos das células inteiras aponta para usos potenciais para aplicações em tempo real (LAY JR, 2000).

5.1.2 Efeito da concentração de células na reprodutibilidade dos espectros

Para verificar qual a quantidade mínima de células bacterianas é requerida para se obter um espectro de massa adequado para as análises, três diferentes quantidades de células de *A. brasilense* FP2 foram processadas por lise celular descrito na seção 5.2.1 de Materiais e Métodos. Uma fração de cada amostra foi utilizada para contagem de UFC em meio NFbHPN lactato.

A Tabela 03 sumariza os picos encontrados em cada quantidade de células bacterianas. Somente 3 picos em comum foram encontrados entre as 3 quantidades de células testadas (destacados na Tabela 03 em negrito) indicando que este fator é crítico para esta técnica. Vários autores tem observado que uma significativa variabilidade dos espectros pode ser atribuída a pequenas variações no número de células utilizado (EVASON, 2001; WILLIAMS et al., 2003; HSIEH et al., 2008).

O número de picos detectados e sua intensidade aumentam com o aumento da quantidade de células bacterianas utilizadas e os melhores resultados foram obtidos utilizando $1,5 \times 10^8$ células. Porém, mais estudos são necessários para verificar se este aumento no número de picos detectados continua a crescer com o acréscimo de células na análise.

Tabela 03 Lista dos picos em comum encontrados no efeito da concentração de células sobre a reprodutibilidade dos espectros

Picos médios	N	Quantidade de células			CV (%)	Erro (ppm)
		$7,2 \times 10^6$ células	$2,5 \times 10^7$ células	$1,5 \times 10^8$ células		
3155,71	1	3155,71				
3349,84	1			3349,84		
3424,87	1			3424,87		
3641,88	1	3641,88				
3694,27	1			3694,27		
3715,61 $\pm 0,2$	2		3715,79	3715,44	0,005	47,10
3791,93 $\pm 0,5$	3	3791,21	3792,35	3792,22	0,013	134,52
3821,16 $\pm 0,6$	2	3820,54	3821,78		0,016	162,08
3924,97 $\pm 0,3$	2		3925,29	3924,66	0,008	80,26
4359,81	1	4359,81				
4753,22	1			4753,22		
4808,02 $\pm 0,3$	2		4808,34	4807,71	0,007	65,52
4894,58 $\pm 0,6$	2		4895,15	4894,01	0,012	116,46
5077,73 $\pm 1,1$	2		5078,83	5076,63	0,022	216,63
5093,39 $\pm 0,5$	3	5092,68	5093,75	5093,74	0,010	98,49
5166,62	1			5166,62		
5377,76 $\pm 0,7$	3	5376,88	5377,98	5378,41	0,012	120,00
6165,56	1			6165,56		
6250,75	1		6250,75			

6295,77 ±0,5	2		6295,81	6295,72	0,001	7,15
6698,76	1			6698,76		
6849,39 ±0,1	2		6849,45	6849,32	0,001	9,49
7224,69	1			7224,69		
7387,77	1			7387,77		
7429,98 ±0,2	2		7429,75	7430,2	0,003	30,28
7848,01	1			7848,01	0,005	47,10

Picos médios: relação m/z média dos picos encontrados nas análises, o desvio padrão está indicado dentro dos parênteses; Mínimo/Máximo: faixa de m/z encontrada; N: frequência dos picos; CV: coeficiente de variação; Erro: medida de erro indicada em ppm.

5.1.3 Efeito da localização das amostras na placa de análise sobre a reprodutibilidade dos espectros

Para verificar a reprodutibilidade dos espectros, uma amostra de lisado celular de *A. brasilense* FP2, crescido por 2 dias a 30°C em meio NFbHPN malato, foi aplicada em 8 pontos diferentes na placa de amostras do espectrômetro de massa. Os espectros obtidos são mostrados na Figura 03. Os picos obtidos foram 77,3% similares indicando uma boa reprodutibilidade na relação m/z dos picos. Entretanto, foi observada variação na intensidade dos picos. Os 8 perfis obtidos mostram picos consistentes indicando que um perfil estável pode ser gerado utilizando o protocolo empregado. A variação de intensidade dos picos não é crítica, uma vez que não é considerada nas análises.

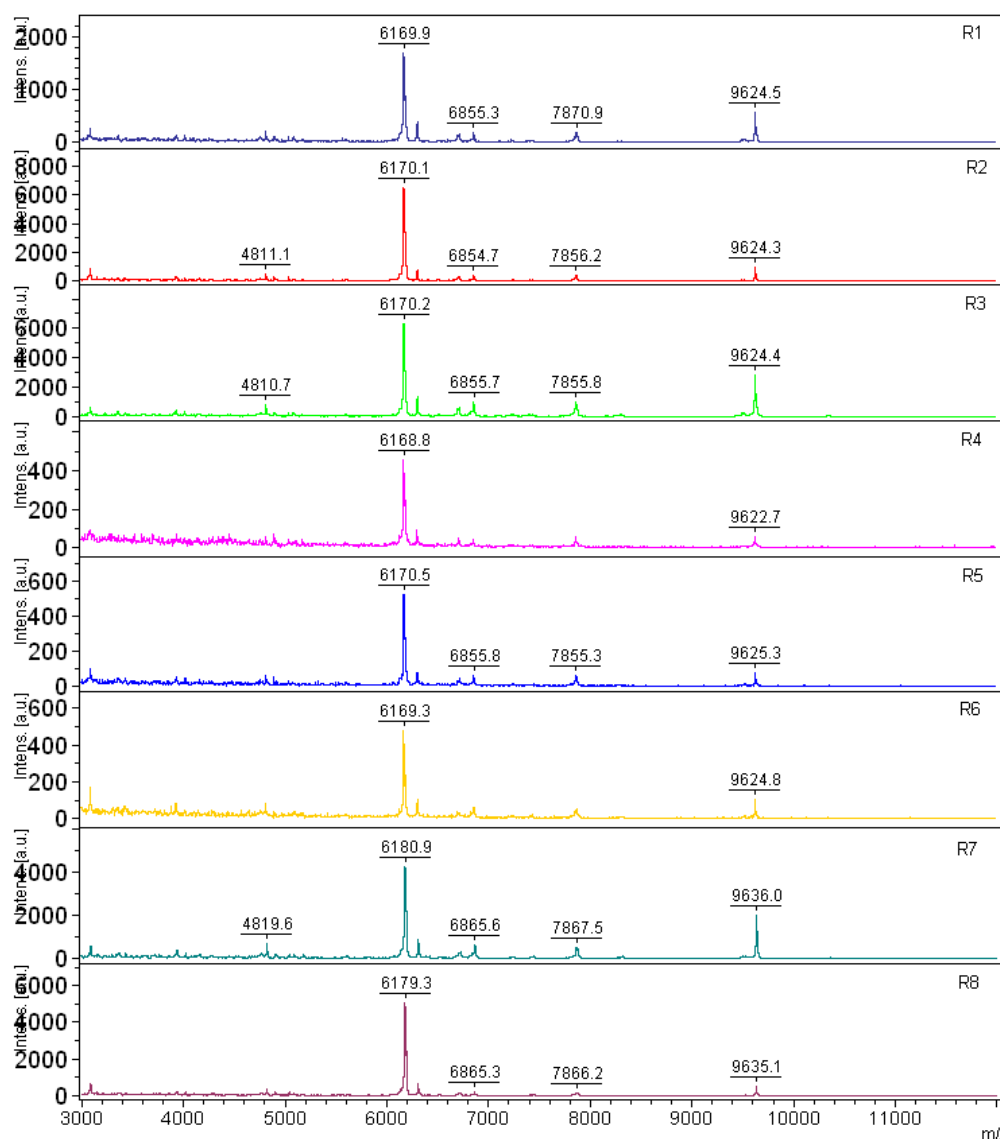


Figura 03 Reprodutibilidade de espectros de massa obtidos de células lisadas de *Azospirillum brasilense* FP2 por MALDI-TOF. Os espectros foram obtidos de uma mesma amostra aplicada em 8 diferentes pontos selecionados aleatoriamente na placa de análise do espectrômetro e visualizados no programa Flex Analysis (Bruker Inc.).

5.1.4 Efeito das variações inter-análises na reprodutibilidade dos espectros

A mesma estirpe bacteriana de *Azospirillum brasilense* FP2, cultivada em meio de cultura NFbHPN em 10 dias diferentes, teve as células lisadas e analisadas por espectrometria de massa MALDI-TOF e os espectros de massa obtidos foram comparados (Tabela 04). As listas de picos obtidas apresentaram 56,7% de similaridade indicando que estes perfis observados são reprodutíveis.

Tabela 04 Lista dos picos em comum encontrados no efeito das variações inter-análises sobre a reprodutibilidade dos espectros

Picos médios	Mínimo	Máximo	CV (%)	Erro (ppm)
3426,35 ±1,5	3424,82	3427,87	0,045	445,75
3695,43 ±1,0	3694,45	3696,40	0,026	264,51
3926,22 ±1,4	3924,80	3927,65	0,036	362,94
4755,77 ±1,4	4754,34	4757,20	0,030	300,87
4809,01 ±0,9	4808,15	4809,88	0,018	179,61
4897,18 ±1,0	4896,14	4898,23	0,021	213,03
5037,39 ±2,3	5035,07	5039,72	0,046	461,12
5078,27 ±1,0	5077,32	5079,23	0,019	187,90
5168,31 ±1,0	5167,36	5169,26	0,018	183,55
6297,27 ±0,8	6296,48	6298,07	0,013	125,98
6700,38 ±0,6	6699,79	6700,96	0,009	87,41
6851,87 ±0,6	6851,25	6852,49	0,009	90,60
7390,36 ±0,5	7389,88	7390,84	0,007	65,16
7850,86 ±0,4	7850,46	7851,27	0,005	51,41
8272,01 ±0,4	8271,58	8272,44	0,005	51,74
9508,34 ±0,3	9508,08	9508,60	0,003	27,50
9616,67 ±0,2	9616,46	9616,89	0,002	22,62

Picos médios: relação m/z media dos picos encontrados nas análises, o desvio padrão está indicado dentro dos parênteses; Mínimo/Máximo: faixa de m/z encontrada; CV: coeficiente de variação; Erro: medida de erro indicada em ppm.

5.1.5 Efeito do meio de cultivo sobre a reprodutibilidade dos espectros

A mesma estirpe bacteriana de *Azospirillum brasilense* FP2 foi cultivada em diferentes meios de cultura, teve as células lisadas e analisadas por espectrometria de massa MALDI-TOF (Figura 04). Os perfis obtidos apresentam número de picos semelhante, porém, houve um deslocamento dos valores de m/z , 37,9% dos picos foram similares dentre os meios analisados (Tabela 05).

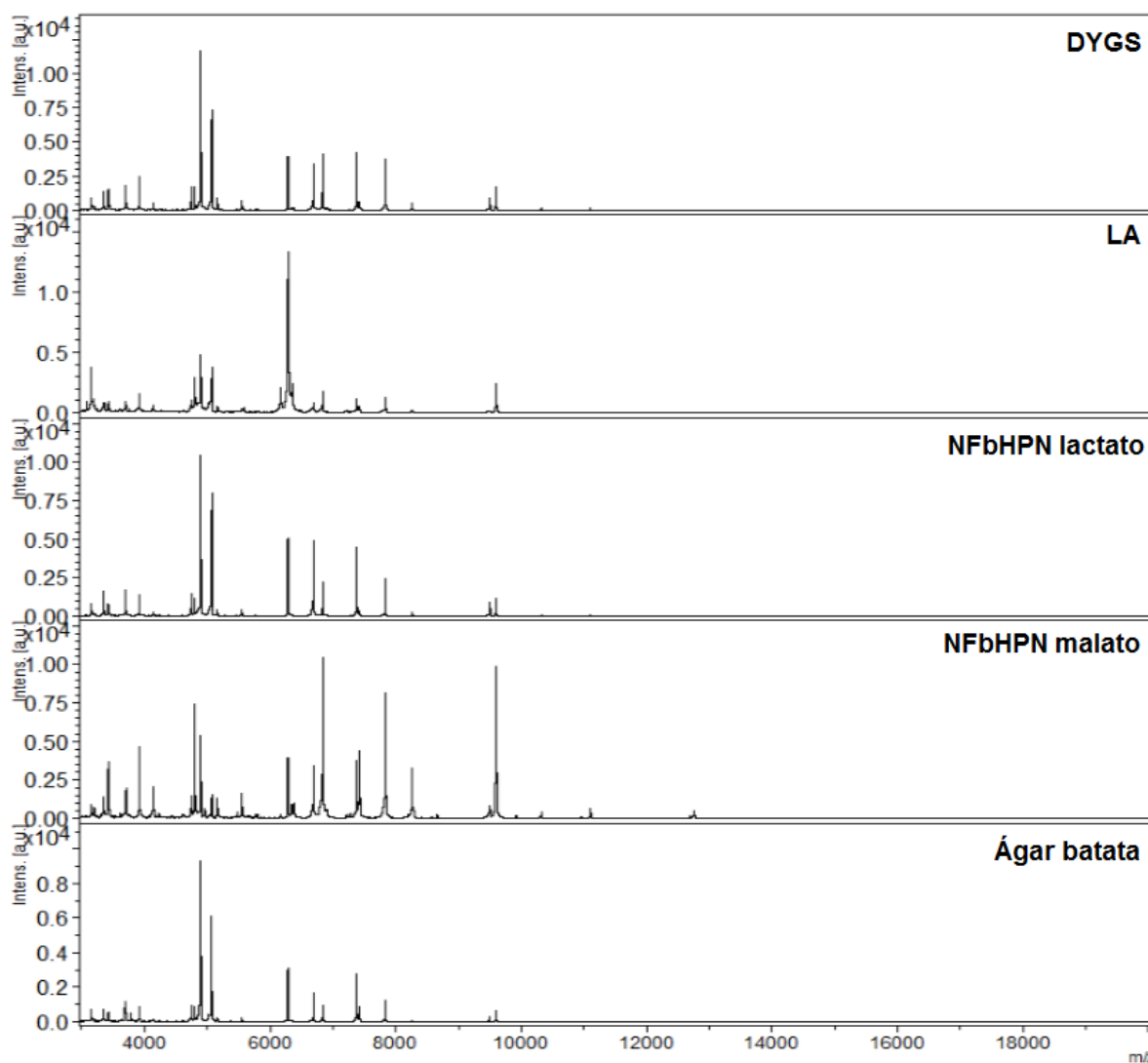


Figura 04 Espectros de massa MALDI-TOF de *Azospirillum brasilense* FP2 cultivado em diferentes meios de cultura. A bactéria foi crescida nos meios de cultura indicados na figura e o procedimento de lisado celular utilizado para análise está descrito no item 5.2.1

Tabela 05 Lista dos picos em comum encontrados no efeito do meio de cultivo sobre a reprodutibilidade dos espectros

Picos médios	mínimo	máximo	CV (%)	Erro (ppm)
3147,98 ±1,0	3146,88	3149,57	0,031	306,61
3694,30 ±0,7	3693,61	3695,64	0,020	198,90
3924,20 ±1,0	3922,61	3925,64	0,025	253,65
4753,09 ±0,9	4752,37	4754,77	0,019	185,55
4807,13 ±0,9	4806,20	4808,48	0,018	184,91
4894,70 ±0,7	4893,65	4895,74	0,014	144,95
5075,71 ±0,7	5074,81	5076,79	0,013	133,61
6294,19 ±1,2	6293,11	6296,35	0,019	185,15
6696,84 ±0,5	6696,21	6697,51	0,007	72,58
6847,99 ±0,9	6846,82	6849,26	0,013	133,11

Picos médios: relação m/z média dos picos encontrados nas análises, o desvio padrão está indicado dentro dos parênteses; Mínimo/Máximo: faixa de m/z encontrada; CV: coeficiente de variação; Erro: medida de erro indicada em ppm.

Os perfis gerados são obtidos de moléculas associadas à superfície das células e proteínas ribossomais abundantes no citoplasma, e que, por sua vez, podem sofrer variação em função das condições ambientais (RAJAKARUNA et al., 2009).

Como observado por outros autores (KEYS et al., 2004; VALENTINE et al., 2005), existe uma visível diferença nos espectros de massa por MALDI-TOF de microrganismos cultivados em diferentes condições. Rajakaruna e colaboradores (2009) cultivaram o isolado clínico HPA 30 de *Staphylococcus aureus* em quatro tipos diferentes de meios de cultura sólidos que incluíam o *Columbia blood agar* (CBA), agar chocolate (CHOC), agar nutriente e o *mannitol salt agar* para avaliar a densidade máxima comparativa dos íons em cada espectro. Eles encontraram grandes diferenças nos perfis das células cultivadas nos meios de cultivo testados, exceto entre CHOC e CBA que diferem somente pela presença de lisado de sangue no último.

Diferentes meios de cultura podem resultar em modificações nos espectros por interferirem especificamente no metabolismo da bactéria e por produzirem íons interferentes. A capacidade de produzir espectros comparáveis utilizando mais de um tipo de meio é importante na construção de banco de dados, porque o mesmo

meio de cultivo nem sempre pode ser utilizado, pois algumas bactérias simplesmente não crescem em determinados meios (LAY JR, 2000).

5.1.6 Efeito da idade das células na reprodutibilidade dos espectros

A idade das células é uma importante variável nas análises de microrganismos por espectrometria de massa MALDI-TOF (LAY JR, 2000). Em muitas espécies bacterianas a morfologia da colônia muda visivelmente alguns dias após o plaqueamento e, portanto, é esperado que os padrões dos espectros de massa por MALDI-TOF podem flutuar com estas variações. (KEYS et al., 2004).

Para estudar o efeito da idade das células nos perfis dos espectros de massa, *A. brasilense* FP2 foi cultivado em meio NFbHPN lactato e as placas foram estocadas á temperatura ambiente por até 14 dias. Os resultados apresentados na Figura 05 indicam que a qualidade geral dos espectros não diminuiu com a o aumento da idade das células. Mas somente 39,3% dos picos foram encontrados em todas as amostras analisadas durante todo o período. Algumas diferenças foram detectadas após o período de estocagem, nos períodos iniciais de crescimento (até o 6º dia), foram observados alguns picos na faixa de 3-4 kDa, porém, eles desapareceram com o crescimento contínuo. Também foram observados alguns picos na faixa de 12-17 kDa que não foram observados nos estágios iniciais de crescimento. Isto também foi observado por Arnold e colaboradores (1999) estudando as mudanças temporais nos espectros de massa de *Escherichia coli* estirpe K-12.

Neste trabalho, nós padronizamos as análises após 1-2 dias de plaqueamento, onde 75% dos picos encontrados foram similares.

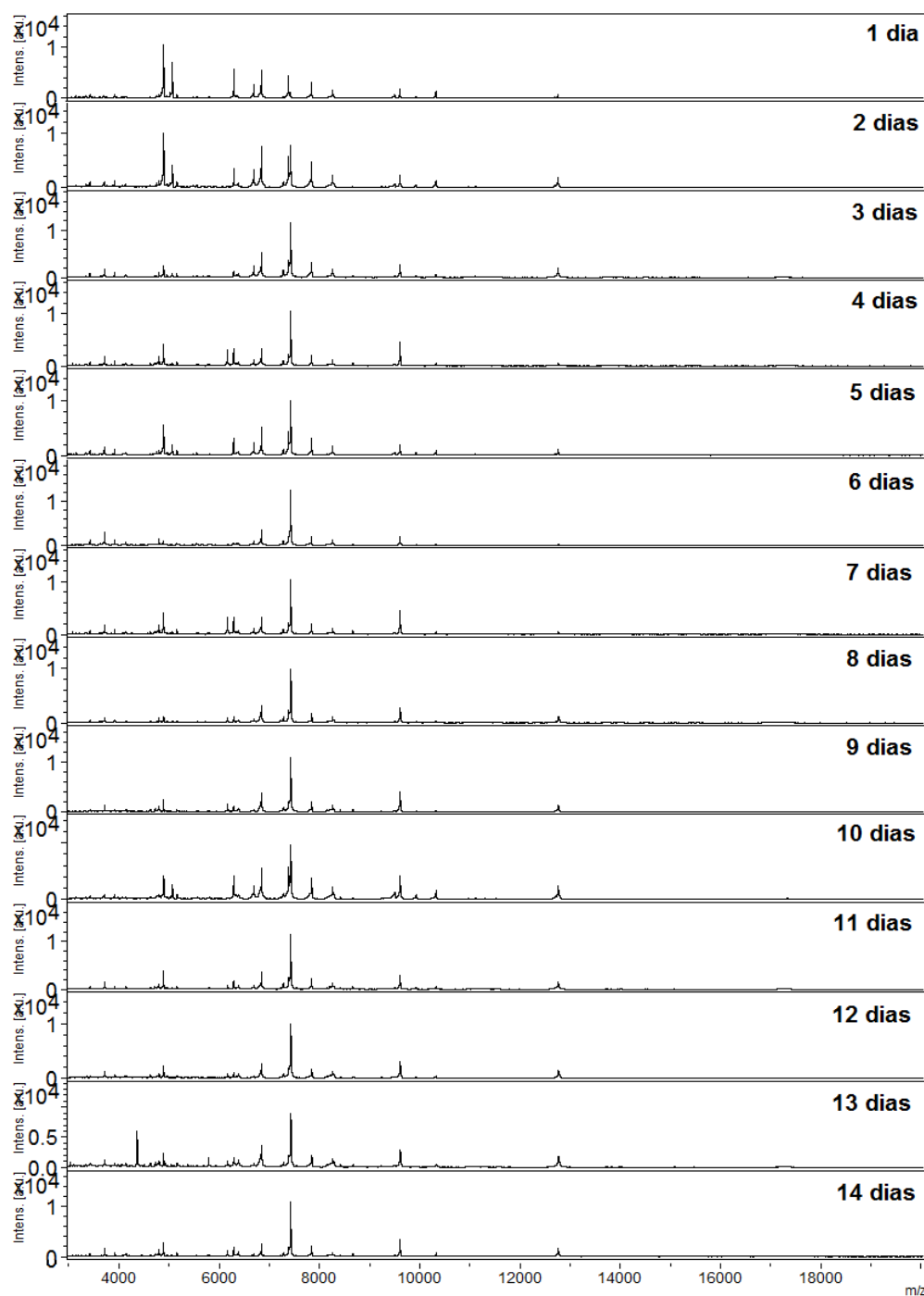


Figura 05 Efeito da idade das células nos perfis dos espectros de massa MALDI-TOF. A. *brasilense* FP2 foi cultivado em meio de cultura NFbHPN lactato e o procedimento de lisado celular utilizado para análise está descrito no item 5.2.1

5.1.7 Variação intra-específica dos perfis de massa MALDI-TOF

Duas estirpes de *Azospirillum brasilense* (FP2 e FP10) foram crescidas em meio de cultura NFbHPN malato, tiveram as células lisadas e analisadas por

espectrometria de massa MALDI-TOF foram lisadas e obteve-se o perfil de cada estirpe que é apresentado na Figura 06. As duas estirpes apresentaram perfis muito similares indicando a impossibilidade de diferenciação entre estas estirpes utilizando a técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF. Porém, Rajakaruna e colaboradores (2009) e Liu e colaboradores (2007) afirmam que a diversidade dentro de espécies pode ser medida pela análise comparativa meticulosa do espectro em cada faixa de massa e que íons de massa específica podem ser utilizados para esta identificação. Mais análises comparativas entre estas estirpes seriam necessárias para tentar diferencia-las através da técnica.

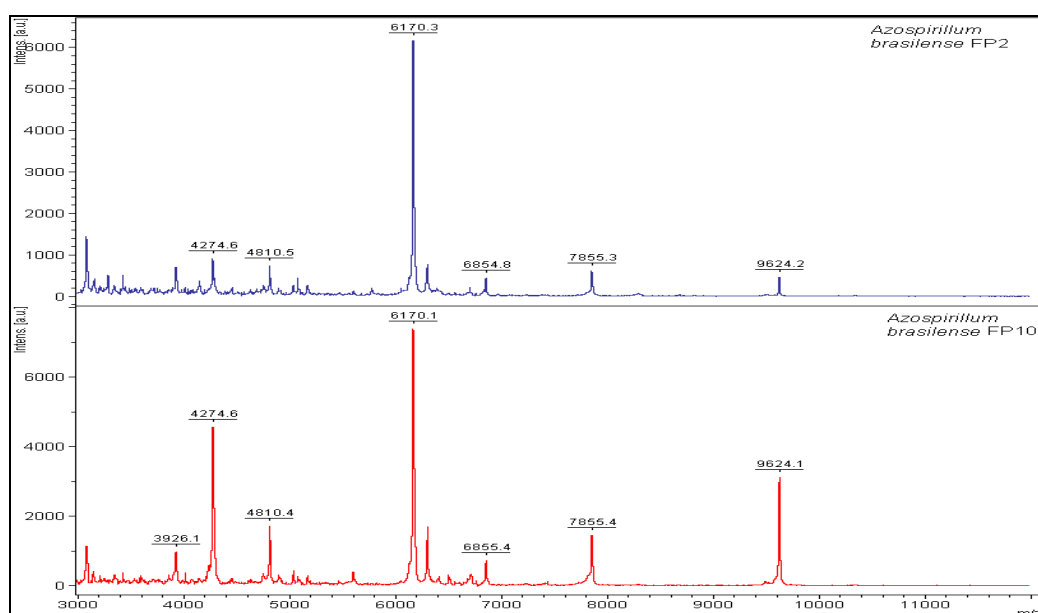


Figura 06 Espectros de massa MALDI-TOF das estirpes de *Azospirillum brasilense* FP2 e FP10

Em resumo, com os experimentos de otimização da técnica foi possível adquirir espectros de massa de boa qualidade e reproduzíveis utilizando lisado celular, quantidade de células bacterianas aproximadamente na concentração de $1,5 \times 10^8$ células e após 1-2 dias de crescimento. Quanto ao meio de cultivo, é recomendado utilizar o mesmo meio para o crescimento dos microrganismos quando se necessita compará-los entre si.

5.2 Diversidade bacteriana associada a plantas de trigo inoculado com *Azospirillum brasilense* FP2

Sementes de trigo cultivar BRS208 inoculadas com *Azospirillum brasilense* FP2 e não inoculadas foram semeadas em condições de campo. Após 13 dias, as plantas foram colhidas e submetidas ao isolamento e contagem de bactérias associadas às raízes e a diversidade das bactérias isoladas avaliadas por espectrometria de massa MALDI-TOF. Um fluxograma mostrando as etapas destes experimentos é mostrado na Figura 07.

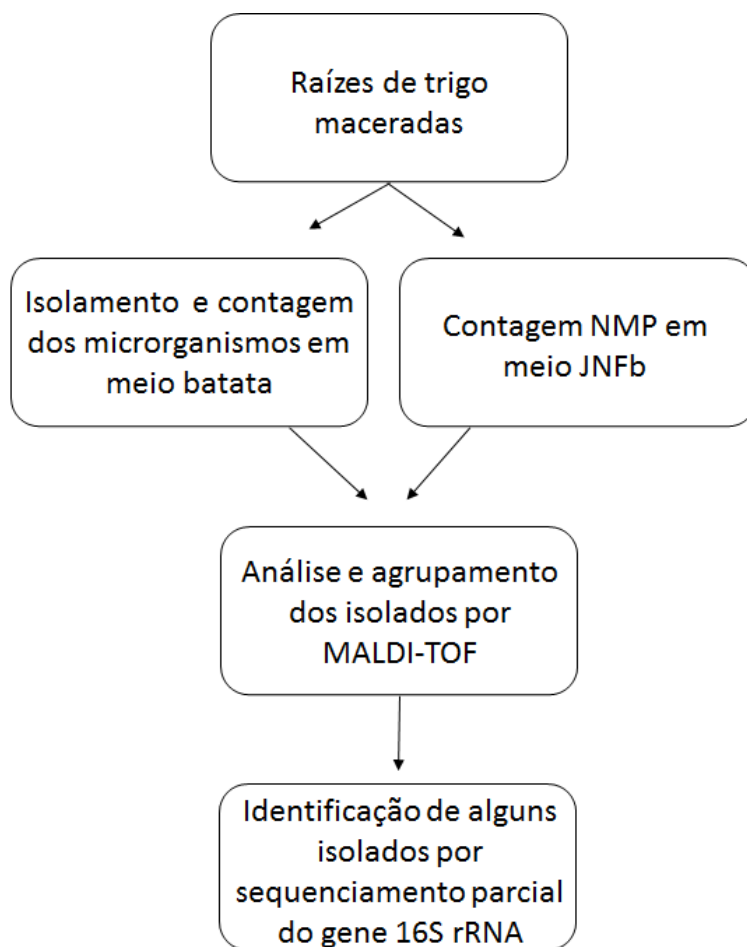


Figura 07 Fluxograma dos experimentos de diversidade bacteriana associada a plantas de trigo inoculado com *Azospirillum brasilense* FP2

5.2.1 Contagem de bactérias totais e bactérias diazotróficas

A contagem de bactérias totais foi feita em meio batata. As plantas inoculadas apresentaram $2,5 \times 10^6$ e as não inoculadas $4,8 \times 10^6$ UFC/g de raiz fresca. Resultados semelhantes foram encontrados por Kari e colaboradores (2001) quando

avaliaram a diversidade da comunidade bacteriana na rizosfera e em raízes de *Brassica napus* crescidas em campo, o número de UFC/g foi de $1,2 \times 10^7$ a $6,3 \times 10^7$ na rizosfera e de 2×10^5 a 1×10^6 bactérias encontradas na raiz.

A contagem de potenciais diazotrofos foi feita através da técnica do número mais provável (NMP) de amostras diluídas e inoculadas em meio JNFb semi-sólido sem fonte de nitrogênio. O trigo não inoculado apresentou $9,5 \times 10^3$ bactérias diazotróficas/g de raiz fresca e o trigo inoculado apresentou 6×10^3 bactérias diazotróficas/g de raiz fresca. Pedraza e colaboradores (2009) obtiveram uma contagem menor estudando a inoculação de *Azospirillum brasilense* 13-2C (S2) e o efeito da adubação nitrogenada no rendimento do grão e na diversidade de bactérias endofíticas no arroz. Eles observaram uma contagem de diazotrofos em meio JNFb na planta inoculada e com adubação nitrogenada de $0,7 \times 10^1$ bactérias diazotróficas e $2,1 \times 10^1$ bactérias diazotróficas nas plantas não inoculadas. Suman e colaboradores (2001) estudando a diversidade endofítica associada a diversos cultivares de cana-de-açúcar na Índia, obtiveram contagens que foram de 10^2 a 10^4 UFC de bactérias diazotróficas/g de peso fresco de raiz.

5.2.2 Análise dos isolados de trigo inoculado com *Azospirillum brasilense* FP2 por espectrometria de massa MALDI-TOF

As plantas de trigo cultivar BRS208, cultivado sob condições de campo foram colhidas no 13º dia após a germinação e tiveram suas raízes maceradas e submetidas ao procedimento de isolamento bacteriano em ágar Batata, um total de $1,2 \times 10^6$ UFC/g de peso fresco de raiz foram obtidos. Aproximadamente 100 colônias da diluição 10^4 foram aleatoriamente coletadas das plantas inoculadas e 100 colônias das plantas não inoculadas.

Os espectros de massa obtidos dos isolados das raízes de trigo foram comparados e agrupados. Os dendrogramas foram gerados pelo programa MS-Analyser (<http://evento2012.x-meeting.com/files/AbstractBook/info/168.html>) utilizando 8 Da de tolerância para a distância liberal. Os dendrogramas obtidos dos isolados do trigo inoculado e não inoculado são mostrados nas Figuras 08 e 09.

Apesar do número maior de isolados sequenciados da planta inoculada, é possível observar uma alteração nos grupos taxonômicos e sua abundância comparando-se as plantas não inoculadas e inoculadas, sugerindo que a estrutura da comunidade de bactérias cultiváveis associadas ao trigo tenha sido influenciada pela presença da bactéria inoculada. Baudoin e colaboradores (2009) estudando o impacto da inoculação com *Azospirillum lipoferum* CRT1 na estrutura genética da comunidade de rizobactérias de milho cultivado em campo também observaram que a inoculação causou uma mudança na estrutura da comunidade de rizobactérias em 7 e 35 dias de crescimento da planta.

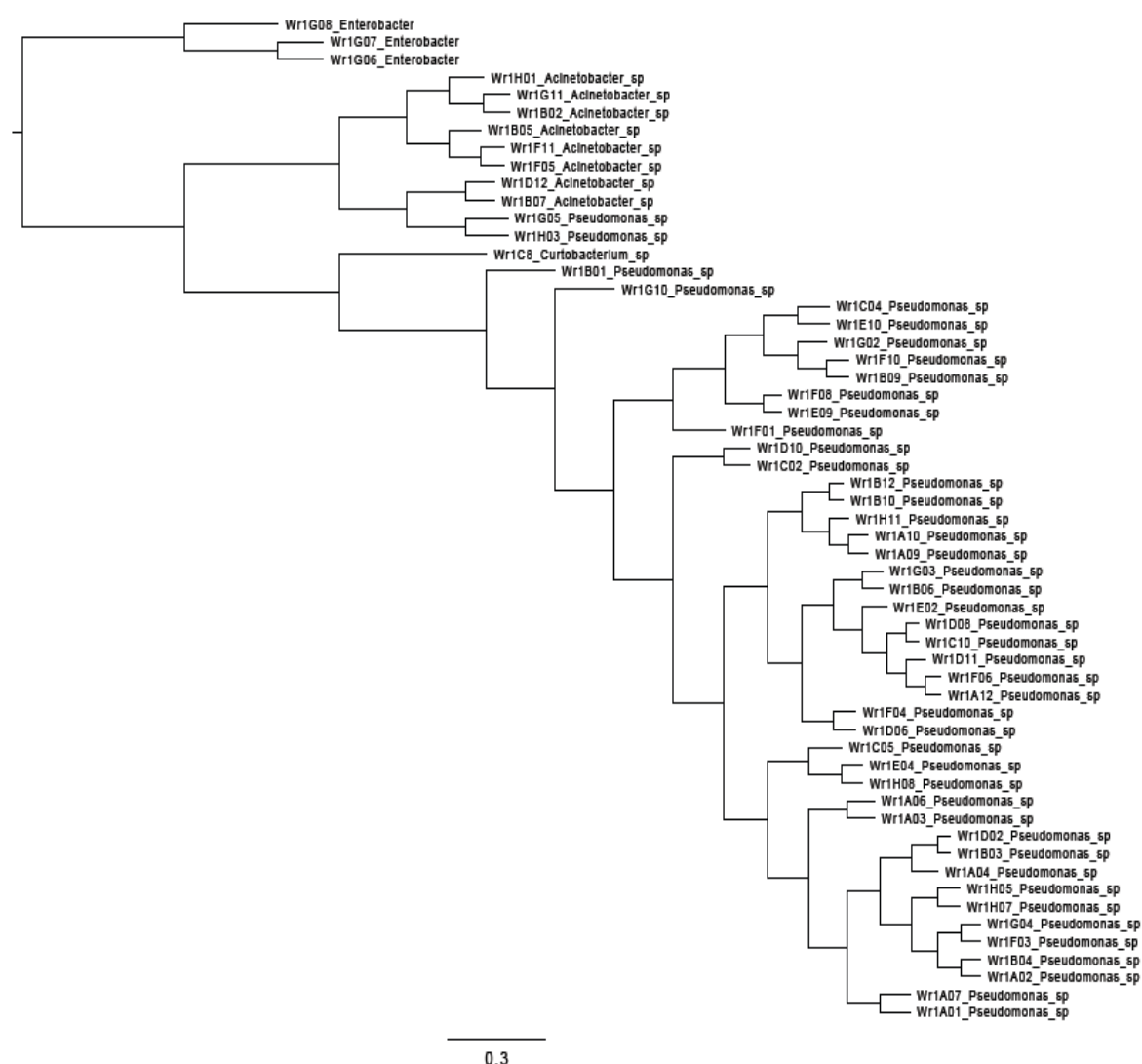


Figura 08 Dendrograma dos isolados de trigo inoculado com *Azospirillum brasilense* FP2 gerados pelo programa MS-Analyser. Os isolados que tiveram o gene 16S rRNA parcialmente sequenciado estão indicados pela identificação taxonômica.

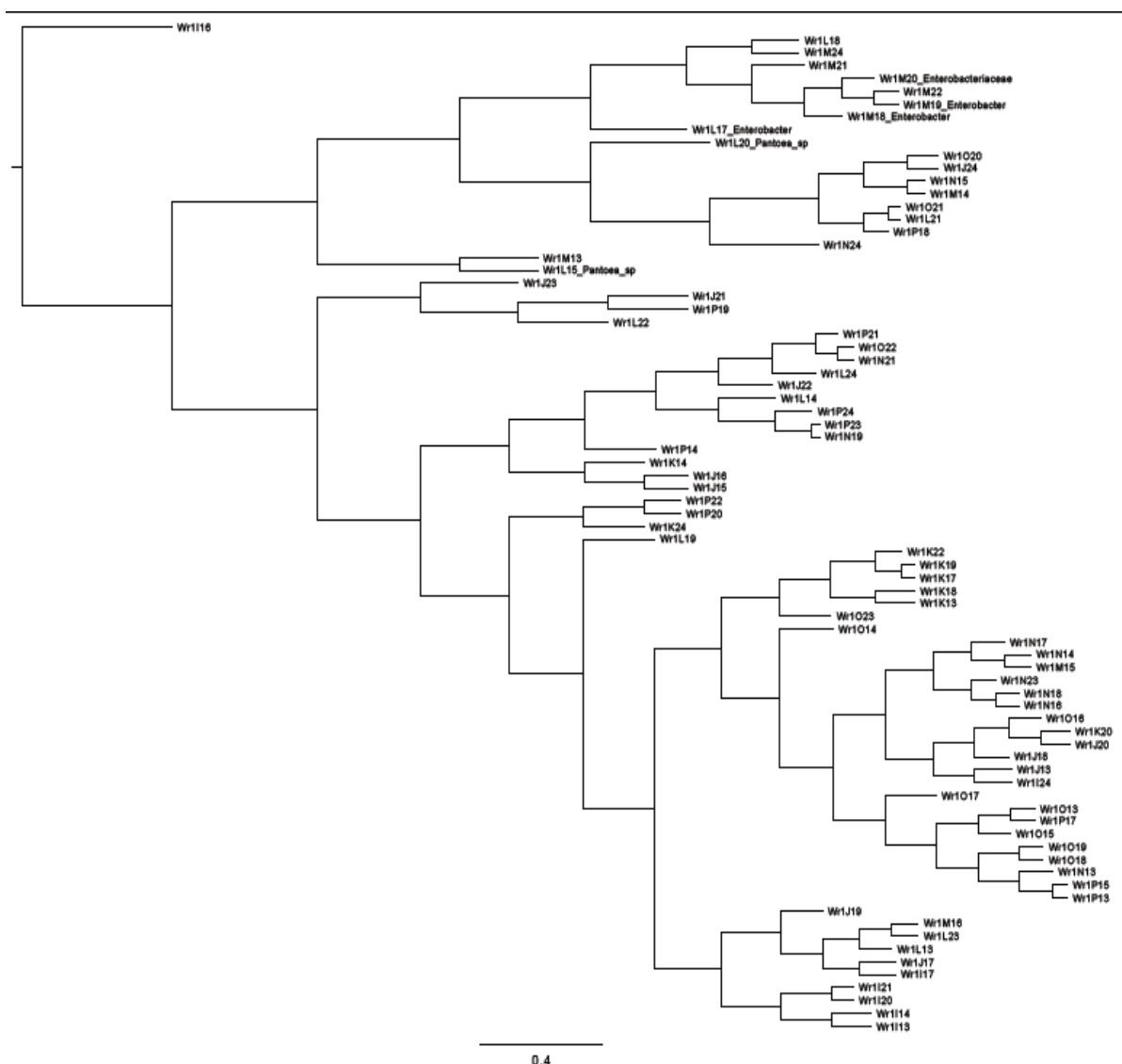


Figura 09 Dendrograma dos isolados de trigo não inoculado gerados pelo programa MS-Analyser. Os isolados que tiveram o gene 16S rRNA parcialmente sequenciado estão indicados pela identificação taxonômica

Os espectros de estirpes isoladas das plantas inoculadas e dos controles não inoculados foram analisados juntos no programa MS-Analyser e o resultado é apresentado na Figura 10. O isolado Wr1I6, pertencente ao controle não inoculado foi agrupado juntamente com o grupo de *Pseudomonas* dos isolados da planta inoculada. O isolado Wr1H02 da planta inoculada foi agrupado com os isolados identificados como *Pantoea* sp do controle não inoculado. O grupo *Enterobacter* sp possui isolados de ambos tratamentos. Os demais perfis se mantiveram sem alterações. Esta análise sugere que algumas espécies bacterianas estão associadas a planta inoculada e outras ao controle não inoculado indicando que a inoculação do

Azospirillum brasilense pode ter modificado a microbiota da planta. Naiman, Latrónico e Salamone (2009) estudando o impacto da inoculação de *A. brasilense* e *Pseudomonas fluorescens* na produção e microbiota da rizosfera de trigo observaram que os perfis fisiológicos da utilização de fonte de carbono da comunidade da rizosfera foram modificados após a inoculação com estes microrganismos.

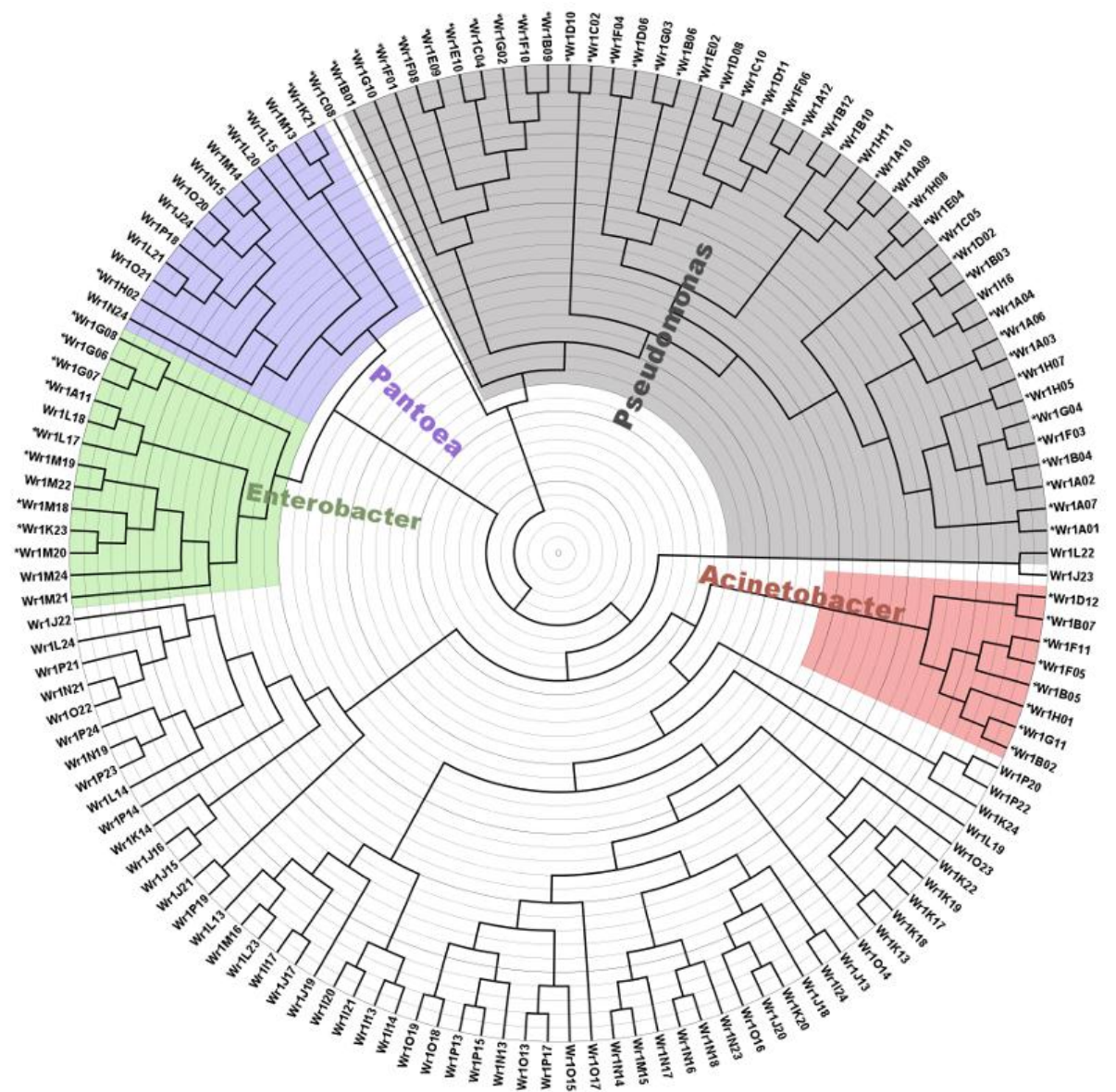


Figura 10 Dendrograma de 138 isolados de raízes de trigo inoculado e não inoculado com *A. brasilense* FP2 construído usando o método da ligação média e o método de correlação para o cálculo das distâncias e erro de 8,0 Da pelo programa MS-Analyser. Os grupos sombreados no dendrograma contêm isolados identificados taxonomicamente (marcados com um asterisco) pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

5.2.3 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA dos isolados

O gene 16S rRNA de isolados representes de alguns perfis espectrométricos obtidos foi amplificado e sequenciado e as sequências posteriormente submetidas a comparação com o banco de dados GenBank para identificação taxonômica das bactérias.

Na Figura 11 são apresentados os perfis de MALDI-TOF dos grupos identificados por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. A espécie *Acinetobacter calcoaceticus* só foi identificada nas plantas inoculadas. O gênero *Acinetobacter* se encontra amplamente distribuído no solo e em ambientes aquáticos (DIJKSHOORN e NEMEC, 2008). O *Acinetobacter calcoaceticus* é descrito como uma bactéria rizosférica solubilizadora de fosfato capaz de promover o crescimento de plantas (PEIX et al., 2009).

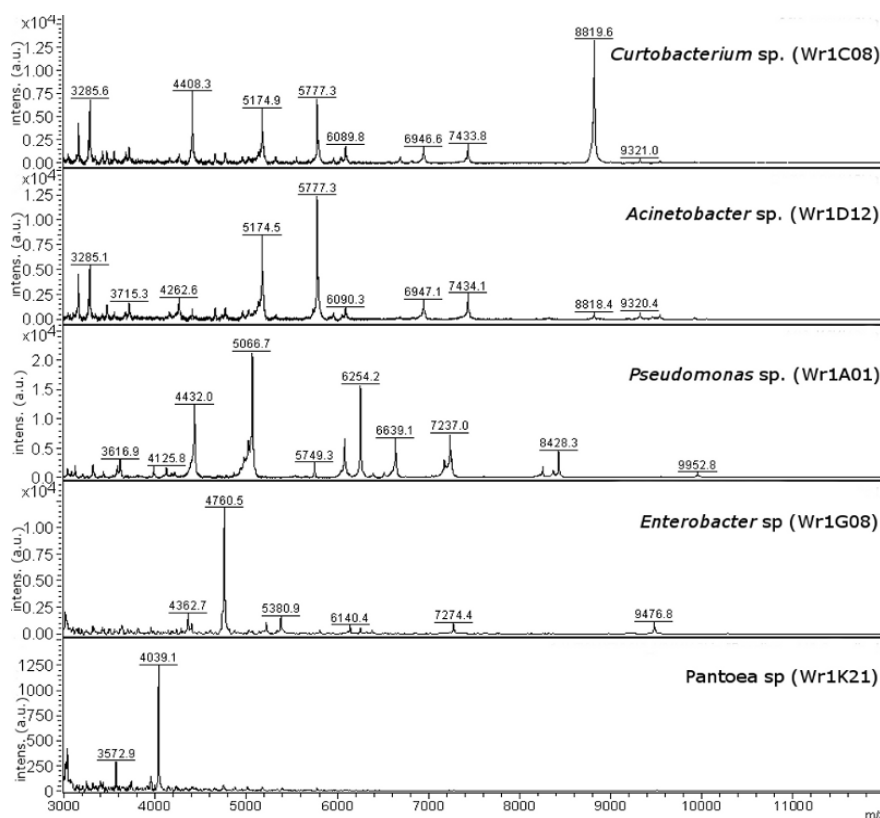


Figura 11 Espectros de massa MALDI-TOF obtidos de isolados de trigo identificados por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Todos os isolados são pertencentes à classe Gammaproteobacteria, distribuídos entre 4 famílias: Enterobacteriaceae, com 2 gêneros e 13 isolados identificados; Pseudomonadaceae, com 1 gênero e 43 isolados identificados; Moraxellaceae, com 1 gênero e 8 isolados identificados e Microbacteriaceae, com 1 gênero e um isolado identificado. *Pseudomonas* foi o gênero predominante, mas *Pantoea*, *Curtobacterium*, *Acinetobacter* e *Enterobacter* também foram encontrados (Figura 09).

O gênero *Pantoea* sp. é comumente encontrado na rizosfera e em raízes (SON et al., 2006). *Pseudomonas* e *Pantoea* têm sido estudadas como inibidoras da ferrugem do trigo e têm apresentado bons resultados (JOHANSSON et al., 2003; KHAN et al., 2006).

Assunção e colaboradores (2009) estudando a diversidade e potencial biotecnológico de microrganismos isolados de sementes de soja observaram que a comunidade bacteriana endofítica cultivável de sementes de soja compreendeu os gêneros: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Chryseobacterium*, *Citrobacter*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Micromonospora*, *Pantoea*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Ochrobactrum*, *Streptomyces* e *Tsukamurella*. Destacou-se o isolado 33B(8) de *Pantoea* sp. com a maior produção de AIA (ácido indol acético).

Uma árvore filogenética foi construída utilizando as 65 sequências parciais do gene 16S rRNA e sequências referência obtidas do banco de dados GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) mostrando que as sequências foram agrupadas de acordo com a identificação taxonômica prévia (Figura 12). O dendograma derivado das análises dos perfis de MALDI-TOF teve boa concordância com a árvore filogenética de sequências parciais do gene 16S rRNA. Contudo, quando estes são comparados fica claro que o dendograma de MALDI TOF possui uma resolução maior que a árvore de sequências de 16S rRNA, separando os isolados que possuem alta identidade de sequência em diferentes sub-grupos.

Esta conclusão também pode ser alcançada quando se analisa a identidade entre os diferentes grupos de sequência. Uma busca utilizando o MEGA-BLAST contra o banco de 16S rRNA do NCBI usando as sequências parciais do gene 16S rRNA obtidas mostrou pouca variação entre os isolados de mesmo grupo. O maior grupo encontrado (43 sequências), identificado como pertencente ao gênero

Pseudomonas, contem sequências com alta identidade com a sequência de *Pseudomonas libanensis* (número de acesso GenBank: NR_024901) com identidades variando de 98% a 99%. A identidade global das sequências deste grupo, obtida quando as sequências são alinhadas entre si, foi de 99,1%, sugerindo que este grupo está fortemente relacionado, possivelmente são estirpes da mesma espécie. Resultados similares foram obtidos para os outros grupos: o grupo de *Acinetobacter* (8 sequências) mostrou maior identidade com *Acinetobacter calcoaceticus* (GenBank: NR_042387) com 99% de identidade e identidade global quando as sequências são alinhadas entre si de 98,8%; *Enterobacter* (9 sequências) mostrou melhor identidade com *Enterobacter cowanii* (GenBank: NR_025566) com 98% a 99% e identidade global de 98,8%; e *Pantoea* (4 sequências) mostrou maior identidade com *Pantoea agglomerans* (GenBank: NR_041978) com 95% a 99% e identidade global de 96,9%. Estes resultados sugerem que os isolados do mesmo gênero são muito próximos, a maioria pertencendo à mesma espécie. Os resultados mostram que MALDI-TOF possui um poder maior de resolução que o sequenciamento do gene 16S rRNA, possivelmente discriminando estirpes.

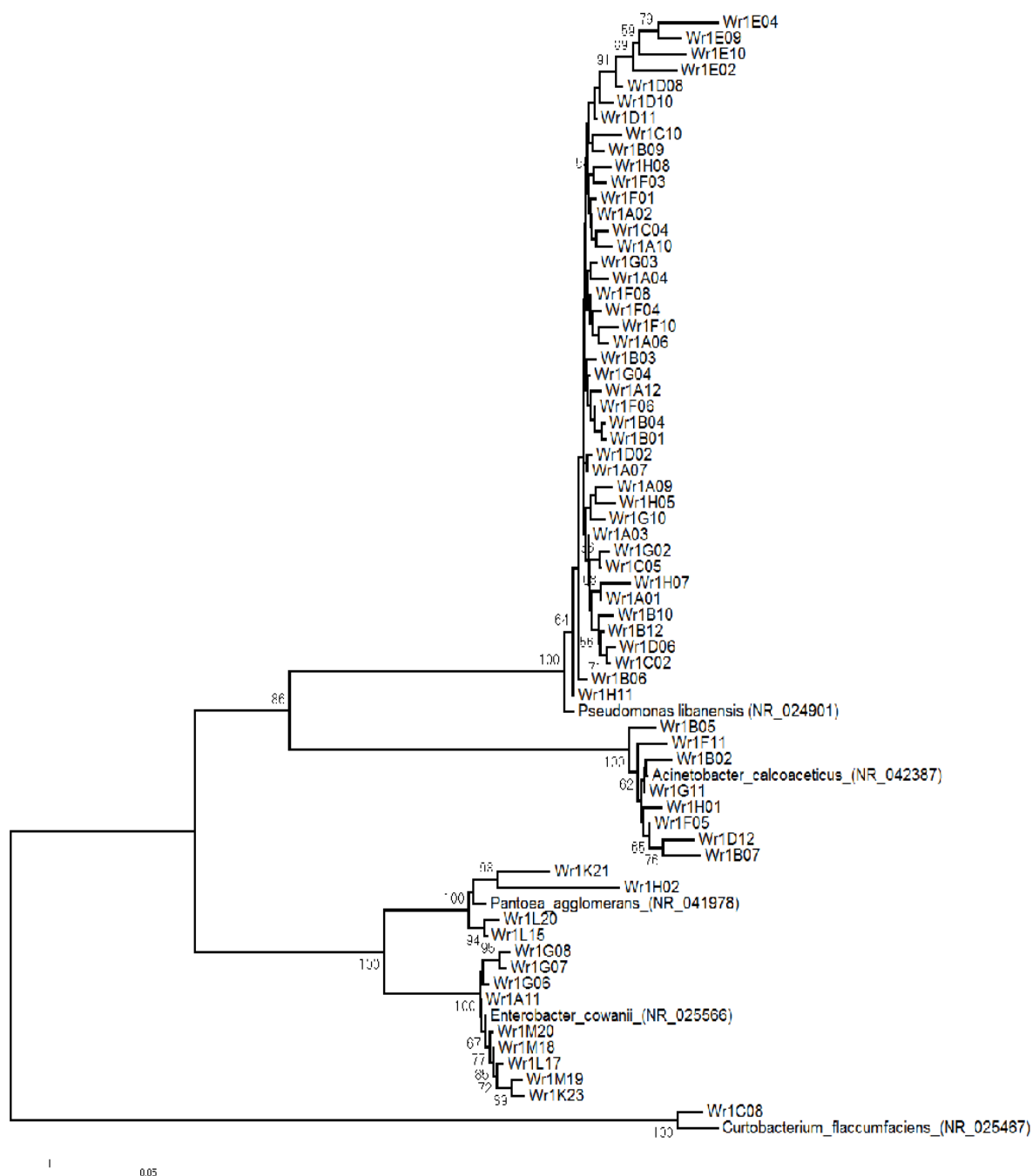


Figura 12 Dendrograma de 65 isolados baseado em sequências parciais do gene 16S rRNA. O dendrograma foi gerado usando o método Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987) e Jukes-Cantor para calcular as distâncias (Jukes e Cantor, 1969); percentagens de *bootstrap* de 10.000 replicatas são mostradas em cada ramo do dendrograma; sequências do banco de dados GenBank de estirpes próximas aos isolados foram incluídas como referência (os números de acesso estão entre parênteses).

5.2.3.1 Análise dos isolados obtidos a partir de meio JNFb semi-sólido livre de nitrogênio por espectrometria de massa MALDI-TOF

Não foi observado o perfil da bactéria *Azospirillum brasilense* FP2 na planta inoculada e também na planta controle. Embora *A. brasilense* seja capaz de crescer em meio batata, especula-se que o seu crescimento nas condições de isolamento não foram favorecidas devido a presença de uma baixa população e/ou da competição com outros organismos. Uma segunda hipótese seria o não aparecimento da bactéria devido a ineficiência do processo de inoculação, o que explicaria a ausência de resposta observada da planta inoculada em relação ao controle (dado não mostrado). De maneira geral, os processos de contagem utilizados neste estudo proporcionam condições de crescimento para bactérias zimógenas, ou seja, bactérias que apresentam metabolismo rápido quando na presença de matéria orgânica que seja facilmente decomposta (SCHINNER et al., 1993). É importante salientar que as colônias analisadas foram isoladas em meio batata na diluição de 10^{-4} , e que, portanto, todos os números de UFC dos grupos taxonômicos identificados encontraram-se na ordem de grandeza de pelo menos 10^5 células por grama de raiz.

Desta forma, foi investigada a presença de *Azospirillum brasilense* nas amostras vegetais utilizando o meio JNFb. A maior diluição com crescimento positivo (10^{-4}) em meio JNFb semi-sólido livre de nitrogênio, tanto da planta inoculada quanto do controle, foram plaqueadas em meio NFbHPN malato sólido e as colônias foram analisadas por espectrometria de massa MALDI-TOF. Os isolados das plantas que não foram inoculadas com *A. brasilense* FP2 apresentaram uma única morfologia: colônias esbranquiçadas com borda irregular (C). Os isolados das plantas inoculadas apresentaram 2 tipos morfológicos: colônias amarelas, puntiformes e com borda regular (CA) e colônias translúcidas de aspecto gomoso (CG). As análises de MALDI-TOF destas colônias (Tabela 06 e Figuras 13 e 14) revelaram que os tipos morfológicos iguais apresentam mesmo perfil sugerindo que pertencem ao mesmo organismo.

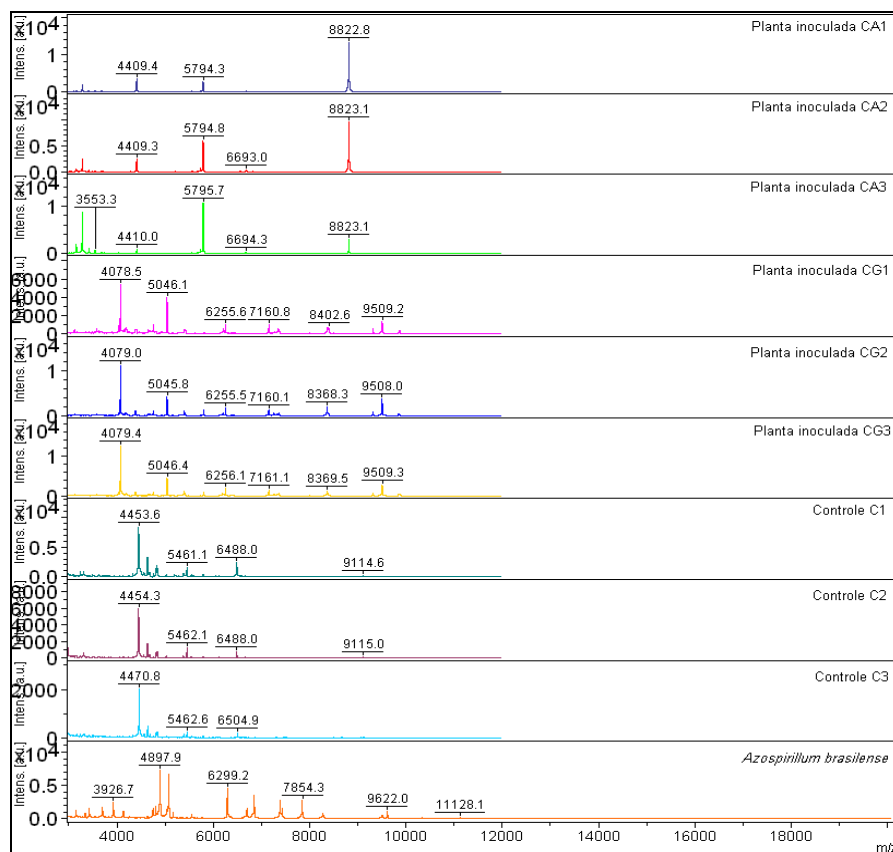


Figura 13 Perfis de espectro de massa MALDI-TOF de diazotrofos isolados de plantas controle não inoculadas com *Azospirillum brasilense* FP2 em meio NFbHPN malato. CA: colônia amarela; CG: colônia gomosa e C: colônia translúcida

Nenhum dos isolados analisados apresentou espectro semelhante ao de *Azospirillum brasilense* (Tabela 06 e Figura 14).

Tabela 06 Perfis de espectros de diazotrofos isolados de trigo em meio NFbHPN malato inoculado com *Azospirillum brasilense* FP2 e do controle

Perfil	Nº de espectros	Estirpes bacterianas
1	1	<i>Azospirillum brasilense</i> FP2
2	3	A-CA1, A-CA2, A-CA3
3	3	A-CG1, A-CG2, A-CG3
4	3	T-C1, T-C2, T-C3
5	1	<i>E. coli</i> BL21

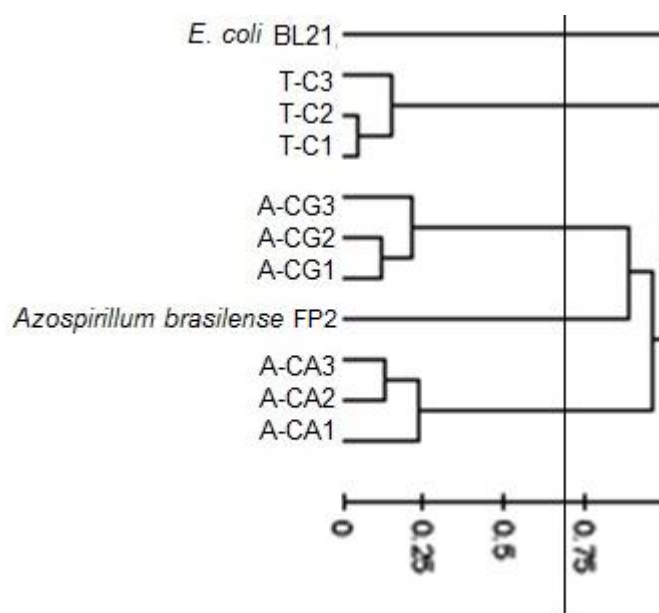


Figura 14 Dendograma dos diazotrofos isolados da planta inoculada, não inoculada e *A. brasilense* FP2 crescidos em meio NFbHPN malato. Linha indica distância de corte utilizada para os agrupamentos.

6 CONCLUSÕES

Com os resultados deste capítulo pode-se concluir que:

- Foi possível otimizar a metodologia para caracterização de microrganismos isolados de plantas por espectrometria de massa MALDI-TOF;
- A técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF possui uma maior resolução quando comparada com o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA;

CAPÍTULO 02: OBSERVAR A COLONIZAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* FP2 EM TRIGO UTILIZANDO AS TÉCNICAS DE FISH E MARCAÇÃO COM O GENE REPÓRTER *gfp*

7 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

7.1 Hibridização *in situ* com oligonucleotídeos fluorescentes (FISH)

Outro método que permite a quantificação de microrganismos sem a necessidade de cultivá-los é o da hibridação *in situ* com sondas fluorescentes, ou FISH (*Fluorescent in situ Hybridization*). Trata-se de um método que permite identificar, por microscopia, microrganismos presentes em diversos ambientes, tendo por base o uso de sondas espécie/estirpe específicas (pequenas sequências complementares aos rRNAs 5S, 16S, 23S ou complementares ao mRNA) marcadas com compostos fluorescentes (MOTER e GÖBEL, 2000; AMANN et al., 1995).

Para a realização da hibridização *in situ* com oligonucleotídeos fluorescentes ou FISH, o RNA não é extraído, mas permanece dentro das células microbianas. Estas são fixadas em solução de paraformaldeído para preservação e formação de poros para penetração da sonda fluorescente. As células são, então, tratadas com tampão contendo formamida e NaCl e incubadas numa temperatura entre 45 a 48°C para hibridização da sonda em regiões específicas. A sonda oligonucleotídica é marcada com fluoróforo que é detectado quando excitado por uma luz de um determinado comprimento de onda (normalmente, luz ultravioleta). A detecção é feita por microscopia de fluorescência, na qual a amostra hibridizada é iluminada com a luz excitante e a luz emitida é observada com o auxílio de filtros específicos. A emissão de sinal é proporcional à quantidade de ribossomos do microrganismo, indicando sua atividade metabólica potencial no ecossistema estudado. Pelo fato das células não serem destruídas, esta técnica permite a visualização morfológica, a contagem, estimativa da abundância, a localização e a distribuição espacial dos microrganismos na amostra (AMANN et al., 1995).

8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Monitorar a colonização de plantas de trigo com *Azospirillum brasilense* FP2 utilizando estirpes marcadas com o gene repórter *gfp*;

b) Observar a colonização de *Azospirillum brasilense* FP2 em condições estéreis e não estéreis utilizando a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) em trigo.

9 MATERIAIS E MÉTODOS

9.1 Testes de viabilidade da semente e do inóculo com *Azospirillum brasilense* FP2

9.1.1 Preparo de inoculante líquido a partir de culturas de *Azospirillum brasilense* FP2

A estirpe de *A. brasilense* FP2 foi cultivada em meio líquido NFbHPN (DÖBEREINER, 1980) contendo glutamato 5 mmol/L como fonte de nitrogênio à 30°C até uma DO_{600} entre 1,5-1,8 (cerca de 48 horas de crescimento) que corresponde a aproximadamente 10^9 células/mL. Neste caso foi mantida a relação de 1/5 de volume de meio para o volume total do frasco e a essa cultura foi adicionado polivinilpirrolidona (PVP) 0,5%.

Para o cálculo da viabilidade das células e determinação do número de unidades formadoras de colônias, as culturas crescidas foram diluídas (10^{-1} até 10^{-7}), plaqueadas nas diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} e contadas pela técnica da micro gota (ROMEIRO, 2012).

9.1.2 Desinfestação das sementes

Sementes de trigo cultivar CD150 foram esterilizadas usando o protocolo descrito por DÖBEREINER e colaboradores (1995) retirando-se as etapas de imersão por quatro horas em água esterilizada como descrito a seguir:

As sementes foram submersas em etanol 95% por 30 segundos, sob agitação a 100 rpm. Em seguida, as sementes foram imersas em solução de hipoclorito acidificado e agitadas por cinco minutos, seguida de quatro lavagens sucessivas de um minuto cada, em água estéril. As sementes foram novamente colocadas em solução de hipoclorito acidificado por cinco minutos e submetidas a três lavagens sucessivas de um minuto em água estéril. Foram em seguida imersas por cinco minutos em peróxido de hidrogênio (100 volumes) e novamente lavadas quatro vezes em água estéril por um minuto cada, sob agitação.

9.1.3 Inoculação das sementes de trigo

As sementes de trigo cultivar CD150 foram colocadas em um saco plástico juntamente com 1 μ L/semente do inoculante (concentração final de 10^6

células/semente) de *A. brasilense* e a mistura foi homogeneizada. As sementes ficaram secando por 30 minutos em ambiente estéril.

9.1.4 Efeito da desinfestação da semente

Este teste foi realizado para verificar se o método de desinfestação da semente empregado influenciaria na taxa e no tempo de germinação. As sementes (tratadas e não tratadas) foram plantadas em vasos de polipropileno (Sigma Inc) contendo aproximadamente 400 gramas de substrato comercial Plantmax® estéril. O experimento foi realizado em quintuplicata, em blocos ao acaso, as sementes foram plantadas a 1 cm da superfície e regadas diariamente com 15 mL de água da torneira autoclavada. Os potes foram mantidos em sala climatizada (~20°C), umidade média de 25%, com um fotoperíodo de 12 horas sob iluminação de intensidade 1.250 lux com lâmpadas brancas fluorescentes. Após 7 dias as plantas foram coletadas, as raízes foram lavadas com água destilada estéril, retirado o excesso de água e pesadas. Foram avaliados também o número de plantas germinadas em cada tratamento e o tempo de emergência.

9.1.5 Efeito da adição de polivinilpirrolidona (PVP) ao inóculo contendo *A. brasilense* FP2

Para esta análise, foi realizada microscopia eletrônica de varredura. Após fixação em Karnovsky (paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M pH 7.2 a 4°C) (Karnovsky, 1965), as amostras foram enviadas ao Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, preparadas e analisadas pela professora Dr^a Lucelia Donatti. O material foi desidratado em série etanólica crescente e acetona, sendo o ponto crítico obtido em um Bal-Tec CPD – 030 com gás carbônico. Em seguida ocorreu a metalização das amostras em ouro obtida em um Balzers SCD – 030. As análises e a documentação do material foram feitas no microscópio eletrônico de varredura JEOL-JSM 6360 LV.

9.2 Hibridização fluorescente *in situ* (FISH)

As análises pela técnica de FISH foram realizadas de acordo com o protocolo de Jha e colaboradores (2009).

9.2.1 Cultura pura

Dois mililitros de uma cultura fresca foram centrifugados a 12.000 *g* por 2 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células microbianas foram fixadas pela adição de 200 μ L de tampão PBS 1x (NaCl (155,17 mM), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (2,97 mM), KH_2PO_4 (1,06 mM) - Invitrogen Inc.) e 600 μ L de paraformaldeído 4% e incubação por uma hora a 4°C. A cultura foi centrifugada e o precipitado de células foi lavado uma vez com tampão PBS 1x, o precipitado foi ressuspenso em 100 μ L de PBS 1x e 100 μ L de etanol 96% gelado (-20°C).

Três microlitros de cada cultura fixada foram depositados na lâmina de vidro e levados para secar a 47°C por 20 min. As células foram desidratadas pela incubação seriada por 3 min cada em etanol 50, 80 e 96% e secadas à temperatura ambiente. A hibridização *in situ* fluorescente foi realizada pela adição de 10 μ L da solução de hibridização (15 ng de cada sonda de hibridização; 0,9 M NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 8,0; formamida 35%; 0,01% SDS) diretamente sobre cada amostra e incubada a 46°C por 1 hora e 30 min. A concentração de formamida depende da sonda utilizada e determina a estringência da hibridização; a concentração de formamida neste trabalho (35%) é recomendada para as sondas utilizadas (Tabela 07). O excesso das sondas foi removido pela incubação das lâminas em uma solução de lavagem (20 mM Tris HCl pH 8,0; 0,1% SDS; 5 mM EDTA pH 8,0; 70 mM NaCl) a 48°C por 15 min. As lâminas foram então lavadas em água, secadas e cobertas pelo reagente AF1/DAPI (Citifluor Inc.) que previne a rápida oxidação dos fluorocromos ampliando o tempo de emissão de fluorescência das amostras hibridizadas.

Tabela 07 Sondas utilizadas neste estudo para identificação de *Azospirillum brasilense* inoculado em trigo

Sonda	Sequência	Especificidade	Referência
EUB 338 mix	EUB 338-I 5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'	Eubacteria	AMANN e LUDWIG 2000
	EUB 338-II 5'-GCAGCCACC CGTAGG TGT-3'		AMANN e LUDWIG 2000
	EUB 338-III 5'-GCTGCCACCCGTAGGTGT-3'		DAIMS et al., 1999
Abras1420	5'-CCACCTTCGGGTAAAGCCA-3'	<i>Azospirillum brasilense</i>	STOFFELS et al., 2001

9.2.2 Raízes

As amostras de plantas foram coletadas 7 dias após a inoculação, lavadas em tampão PBS 1x e cortadas em secções de aproximadamente 1 cm. As raízes foram desidratadas pela incubação seriada por 3 min cada em etanol 50, 80 e 96%. A hibridização *in situ* fluorescente foi realizada a 46°C por 2 horas pela adição de 50 µL da solução de hibridização (50 ng de cada sonda de hibridização; 0,9 M NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 8,0; formamida 35%; 0,01% SDS) sobre cada amostra de raiz. O excesso das sondas foi removido pela incubação das raízes em uma solução de lavagem (20 mM Tris HCl pH 8,0; 0,1% SDS; 5 mM EDTA pH 8,0; 70 mM NaCl) a 48°C por 20 min. As raízes foram então lavadas em água, secadas e cobertas pelo reagente AF1/DAPI (Citifluor Inc.).

As raízes foram depositadas entre 2 lamínulas de vidro e observadas em microscópio de varredura confocal a laser LSM 510 Axiovert 100 M (Zeiss, Oberkochen, Germany). Este microscópio está equipado com um laser de íons de Argônio para a excitação do comprimento de onda de 488 nm para fluoróforos que emitem a cor verde e dois lasers de Hélio neon que promovem a excitação nos comprimentos de onda de 543 e 633 nm para os fluoróforos Cy3 (vermelho) e Cy5 (azul) respectivamente. Para cada hibridização das amostras de raízes, as sondas EUB338 mix e Abras 1420 foram utilizadas combinadas, cada uma marcada com um fluoróforo de cor diferente. Nas imagens é possível observar também a autofluorescência da clorofila em verde. Como a sonda Abras1420 é específica para *A. brasilense*, somente os sinais que mostraram a combinação das duas cores dos fluoróforos utilizados (azul e vermelho), resultando em um sinal cor magenta, foram

considerados positivos para *A. brasilense*. As imagens foram analisadas utilizando o programa LSM 510 versão 4.2 (Zeiss, Oberkochen, Germany).

9.3 Monitoramento da colonização de plantas com *Azospirillum brasilense* FP2 utilizando estirpes marcadas com o gene repórter *gfp*

9.3.1 Marcação da estirpe de *Azospirillum brasilense* com o gene repórter *gfp*

Para monitorar a colonização das raízes de trigo por *A. brasilense* FP2, esta estirpe foi marcada com o gene repórter *gfp*. O plasmídeo pHRGFPGUS (RAMOS et al., 2002) foi transferido para a estirpe FP2 de *A. brasilense* por conjugação com *E. coli* S17.1 contendo o plasmídeo. A estirpe de *A. brasilense* (receptora) e *E. coli* S17.1 pHRGFPGUS (doadora) foram cultivadas até saturação nos meios NFbHPN e LB (SAMBROOK et al., 1989), respectivamente. Cinco microlitros da cultura de *E. coli* foram utilizados para inocular 2 mL de meio LB sem antibióticos e 100 µL da cultura de *A. brasilense* foram utilizados para inocular 5 mL de meio NFbHPN sem antibióticos. As culturas foram mantidas a 37°C e 30°C, respectivamente, sob agitação constante (120 rpm) por 5 horas. Em seguida, 50 µL de *A. brasilense* foram misturados com 5 µL de *E. coli*, as células foram depositadas como uma gota em meio LA/NFbHPN (1:1) e incubadas a 30°C durante 20 horas. A massa de células foi raspada, suspensa em 1 mL de NFbHPN, diluída e plaqueada em meio NFbHPN (contendo NH₄Cl 20 mM) e os antibióticos estreptomicina (80 µg/mL), ácido nalidíxico (10 µg/mL) e canamicina (100 µg/mL). A seleção dos clones positivos foi feita também pela visualização da fluorescência sob radiação UV em transiluminador ou por microscopia de fluorescência utilizando microscópio Jenaval Zeiss MF-AKS (Carl Zeiss Jena, Germany).

9.3.2 Efeito da inoculação de sementes de trigo com a bactéria *A. brasilense* FP2 marcada com o gene *gfp*

Este experimento teve como objetivo avaliar o efeito da inoculação de *A. brasilense* em sementes de trigo superficialmente desinfestadas. O experimento foi realizado com 10 replicatas de cada condição: sementes tratadas e inoculadas (E-I), sementes tratadas e não inoculadas (E-NI), sementes não tratadas e inoculadas (NI-I) e sementes não tratadas e não inoculadas (NE-NI).

As sementes foram plantadas e mantidas conforme descrito no item 2.7.1. Foram realizadas coletas aos 5 e 10 dias após a emergência. A cada coleta os vasos foram escolhidos por sorteio.

9.3.3 Contagem da população de bactérias associadas ao trigo

As raízes foram separadas, pesadas e colocadas em solução salina, na proporção 1:10 (p/v). Em seguida as raízes em solução salina foram trituradas em almofariz, mantidas em repouso à temperatura ambiente por, no mínimo, 1h e diluídas serialmente até 10^{-8} . As diluições 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} e 10^{-8} foram plaqueadas em meio NFbHPN contendo os antibióticos adequados.

9.3.4 Análises dos dados obtidos

Os dados de cada tratamento foram avaliados pelo teste F, que compara as variâncias e pelo teste T, que compara as médias, em um nível de 95% de confiança utilizando o Excel (Microsoft Inc.).

10 RESULTADOS E DISCUSSÃO

10.1 Inoculação de trigo com *Azospirillum brasilense* FP2

Os efeitos da desinfestação da semente e adição de polivinilpirrolidona (PVP) ao inoculante contendo *A. brasilense* FP2 foram estudados a fim de conhecer a influência destes tratamentos sobre a inoculação de sementes de trigo. A marcação da bactéria *A. brasilense* FP2 com *gfp* e seu efeito em plantas de trigo cultivar CD 150 também foi analisada com o objetivo de acompanhar a população da bactéria inoculada.

10.1.1 Efeito da desinfestação da semente

Os dados obtidos da pesagem de cada planta (dados não mostrados) foram avaliados em um nível de 95% de confiança pelo teste F e pelo teste T. Os resultados mostraram que as médias são estatisticamente iguais, portanto o método de desinfestação utilizado não interfere no crescimento da planta. Por outro lado, foi observado um decréscimo na taxa de germinação de 98% para 80% nas plantas submetidas à desinfestação das sementes.

Dreschel e Baldani (2006) estudando métodos de desinfestação superficial para obtenção de sementes de milho livres de microrganismos, estudaram 6 diferentes métodos. O método de desinfestação com hipoclorito acidificado foi mais eficiente para as sementes sem fungicida, desinfestando sem prejudicar a germinação das sementes do cultivar BR 473 e Eldorad.

10.1.2 Efeito da adição de polivinilpirrolidona (PVP) ao inoculante contendo *A. brasilense* FP2

A fim de verificar o efeito da adição de PVP ao inóculo contendo *A. brasilense* FP2 foi realizada microscopia eletrônica de varredura no laboratório da Prof^a. Dr^a. Lucélia Donatti do departamento de Biologia Celular desta universidade. Foi observado maior número de células aderidas à semente quando foi adicionado PVP (Figura 15) sugerindo que este composto pode ser utilizado eficientemente para melhorar a aderência das células bacterianas à semente. O PVP auxilia na cobertura

das sementes, protege as células bacterianas contra a dessecação durante a secagem a vácuo e, assim, aumenta a sobrevivência celular (DEAKER et al., 2007).

Velineni e Brahmaaprakash (2011) estudaram a sobrevivência e capacidade de solubilização de fosfato de *Bacillus megaterium* em inoculantes líquidos sob alta temperatura e estresse osmótico e observaram que a presença de osmoprotetores como o PVP protegeram as células bacterianas e mantiveram uma elevada população no inoculante.

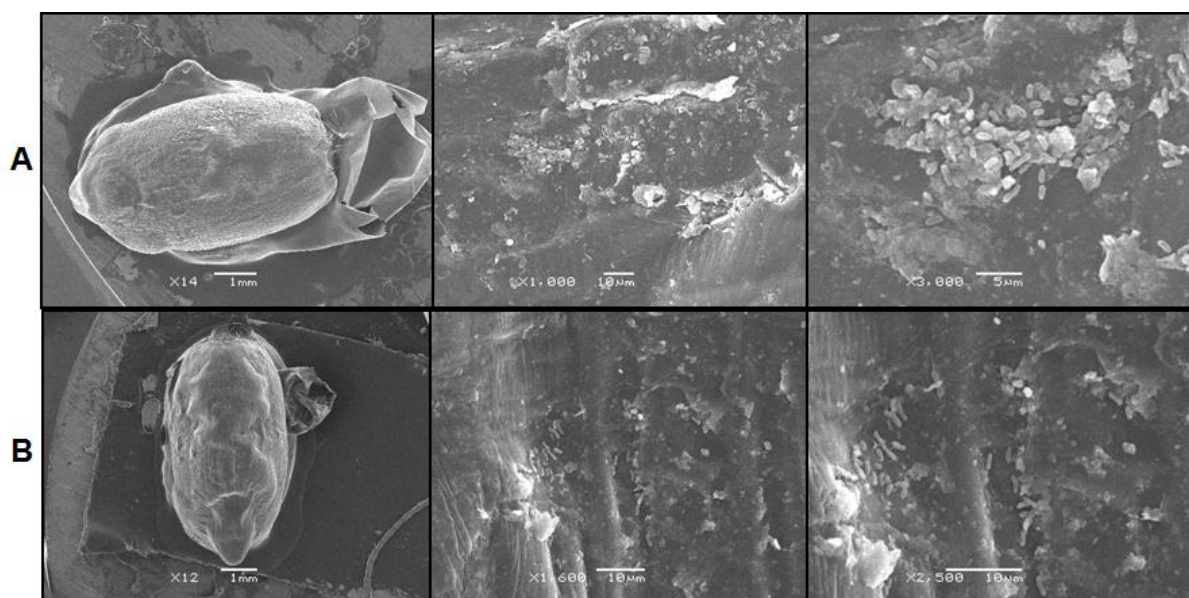


Figura 15 Eletromicrografia de varredura da superfície de semente de trigo inoculado com *Azospirillum brasilense* FP2 na presença (A) ou ausência (B) de 0,5% de PVP. As barras indicam a magnificação.

10.1.3 Efeito da inoculação de sementes de trigo cultivar CD150 com a bactéria *A. brasilense* FP2 marcado com *gfp*

O plasmídeo pHRGFPGUS contendo o gene *gfp* foi inserido em *A. brasilense* FP2 e as bactérias expressando o gene repórter estão mostradas na Figura 16. A estirpe marcada foi inoculada em trigo cultivar CD150 e o efeito desta inoculação foi avaliado.

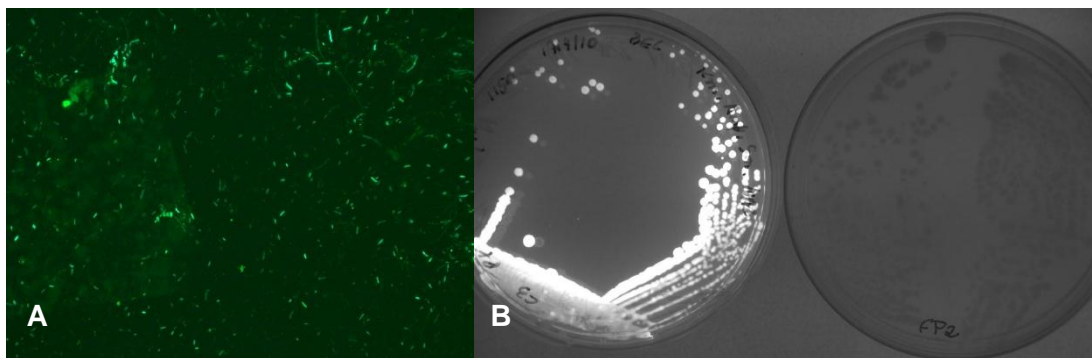


Figura 16 A: imagens de microscopia de fluorescência de células de *Azospirillum brasilense* FP2 com o gene *gfp* visualizadas em microscópio de fluorescência com aumento de 400x utilizando um fotomicroscópio Zeiss MF-AKS; B: colônias crescidas em meio NFbHPN lactato de *A. brasilense* com o gene *gfp* (esquerda e sem o gene (direita) visualizadas em transiluminador sob luz UV.

Na Tabela 08 estão os valores em gramas de peso fresco obtidos para planta total e raízes das plantas em cada tratamento no 5º e 10º dias após a germinação.

Tabela 08 Efeito da desinfestação superficial e inoculação de sementes de trigo cultivar CD 150 com a bactéria *Azospirillum brasilense* FP2 contendo o plasmídeo pHRGFPGUS

Sementes não tratadas não inoculadas				Sementes não tratadas inoculadas			
5 dias		10 dias		6 dias		10 dias	
peso fresco (g)		peso fresco (g)		peso fresco (g)		peso fresco (g)	
Planta total	Raiz	Planta total	Raiz	Planta total	Raiz	Planta total	Raiz
0,25	0,07	0,31	0,06	0,24	0,09	0,38	0,13
0,29	0,1	0,31	0,08	0,25	0,08	0,32	0,08
0,26	0,1	0,26	0,05	0,24	0,07	0,38	0,12
*0,27±0,01 6	*0,09±0,01 2	*0,29±0,02 0	*0,06±0,01 1	*0,24±0,00 4	*0,08±0,00 8	*0,36±0,02 4	*0,11±0,01 9

Sementes tratadas não inoculadas				Sementes tratadas inoculadas			
6 dias		10 dias		5 dias		10 dias	
peso fresco (g)		peso fresco (g)		peso fresco (g)		peso fresco (g)	
planta total	Raiz	planta total	Raiz	Planta total	Raiz	Planta total	Raiz
0,22	0,07	0,29**	0,07	0,23	0,10	0,44**	0,18
0,2	0,06	0,26**	0,06	0,19	0,06	0,46**	0,13
*0,21±0,01	*0,07±0,01	*0,28±0,02	*0,07±0,01	*0,21±0,02	*0,08±0,02	*0,45±0,01	*0,16±0,02

Cada valor corresponde à média dos valores para 2-3 plantas crescidas no mesmo vaso.

*valores médios e estimativa do desvio padrão.

**diferença estatística pelo teste T (95%).

Não houve diferença entre as médias quando se comparou os tratamentos entre sementes inoculadas ou não inoculadas, exceto para as plantas cuja semente foi desinfestada e a coleta foi realizada após 10 dias de germinação onde o tratamento com inoculação teve efeito positivo significativo no peso total da planta.

Em 5 dias após a germinação não foi possível realizar a contagem do microrganismo inoculado pois foi utilizado o meio NFbHPN contendo os antibióticos para os quais a estirpe é resistente (estreptomicina-80 µg/mL e ácido nalidíxico-10 µg/mL) e também o antibiótico cujo gene de resistência está somente no plasmídeo (canamicina-100 µg/mL). Não houve crescimento, provavelmente devido a perda do plasmídeo pelo microrganismo. Em 10 dias após a germinação foi feita a contagem em 2 tipos de meios: um contendo os antibióticos aos quais a estirpe é resistente e no outro, além destes, foi adicionado também o antibiótico do plasmídeo. Foi observado crescimento nas placas contendo somente os antibióticos marcadores da estirpe FP2. O número médio de *A. brasilense* FP2 nas plantas cuja semente não foi esterilizada foi de $3,7 \times 10^2$ UFC/g de peso fresco e para as plantas cuja semente passou pelo processo de desinfestação foi de $7,6 \times 10^3$ UFC/g de peso fresco.

Considerando a importância do monitoramento da estirpe inoculada para o entendimento da dinâmica do processo de promoção do crescimento vegetal, optamos utilizar as técnicas de Hibridização fluorescente *in situ* (FISH) e PCR quantitativo (qPCR).

10.2 Hibridização fluorescente *in situ*

Foi utilizado a técnica de FISH com a finalidade de observar a colonização de *A. brasilense* em raízes de trigo em condições estéreis e não estéreis.

Para determinar a capacidade de ligação das sondas à bactéria alvo foi realizada a hibridização com culturas puras de *A. brasilense* FP2 e *A. lipoferum* como controle negativo. Nesta hibridização as sondas foram utilizadas separadas (Figura 17, colunas 1 e 2) ou em conjunto (Figura 17, coluna 3). É possível observar que a sonda Abras1420 não se ligou ao controle negativo *A. lipoferum* (Figura 17-1C) e quando as duas sondas foram utilizadas em conjunto (Figura 17-3C), somente

a sonda EUBmix hibridizou às células de *A. lipoferum* indicando a especificidade da sonda Abras1420.

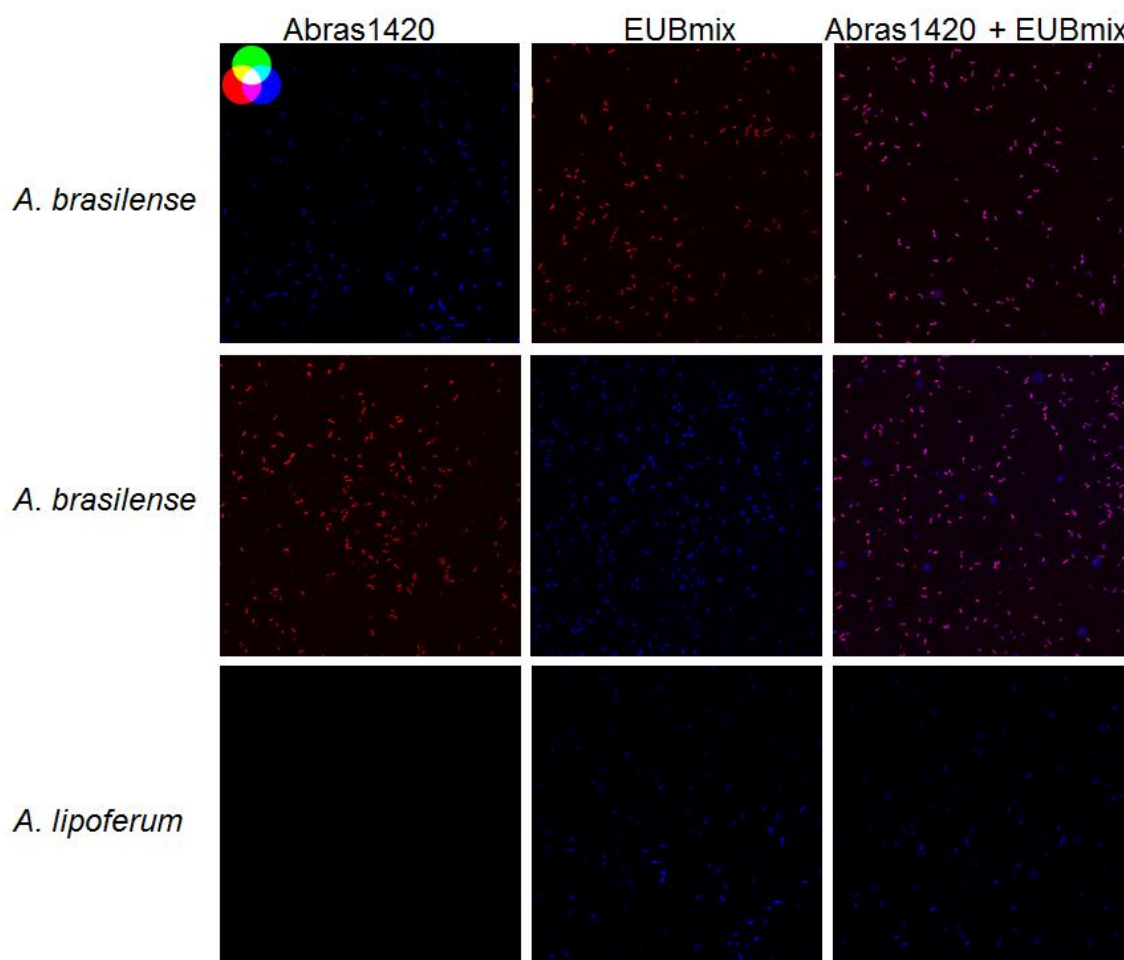


Figura 17 Hibridização fluorescente *in situ* de células de *A. brasilense* FP2 e *A. lipoferum* com a sonda Abras1420, contendo os fluoróforos Cy5 (azul) e Cy3 (vermelho) e com a sonda EUBmix contendo os fluoróforos Cy5 (azul) e Cy3 (vermelho). Na última coluna as duas sondas foram utilizadas em conjunto na hibridização

As duas sondas foram então utilizadas para visualizar bactérias aderidas às raízes de trigo variedade Schöndorfer em condições estéreis e cultivado em casa de vegetação. Na Figura 18 é possível observar um aglomerado de células de *A. brasilense* FP2 (indicado pelas setas) aderido nas raízes de trigo em condições estéreis. Uma vez que ambas as sondas, Abras1420 (Cy3, *A. brasilense*) e EUBmix (Cy5, bactéria), marcaram as células resultando a coloração magenta referente à mistura das cores azul e vermelha (Figura 18D).

Análises pela técnica de FISH de *A. brasilense* colonizando raízes de trigo cultivado em solo revelaram que esta espécie forma microcolônias ou agregados, mostrando preferência pelos pêlos radiculares e região de elongação da raiz (ASSMUS et al., 1995).

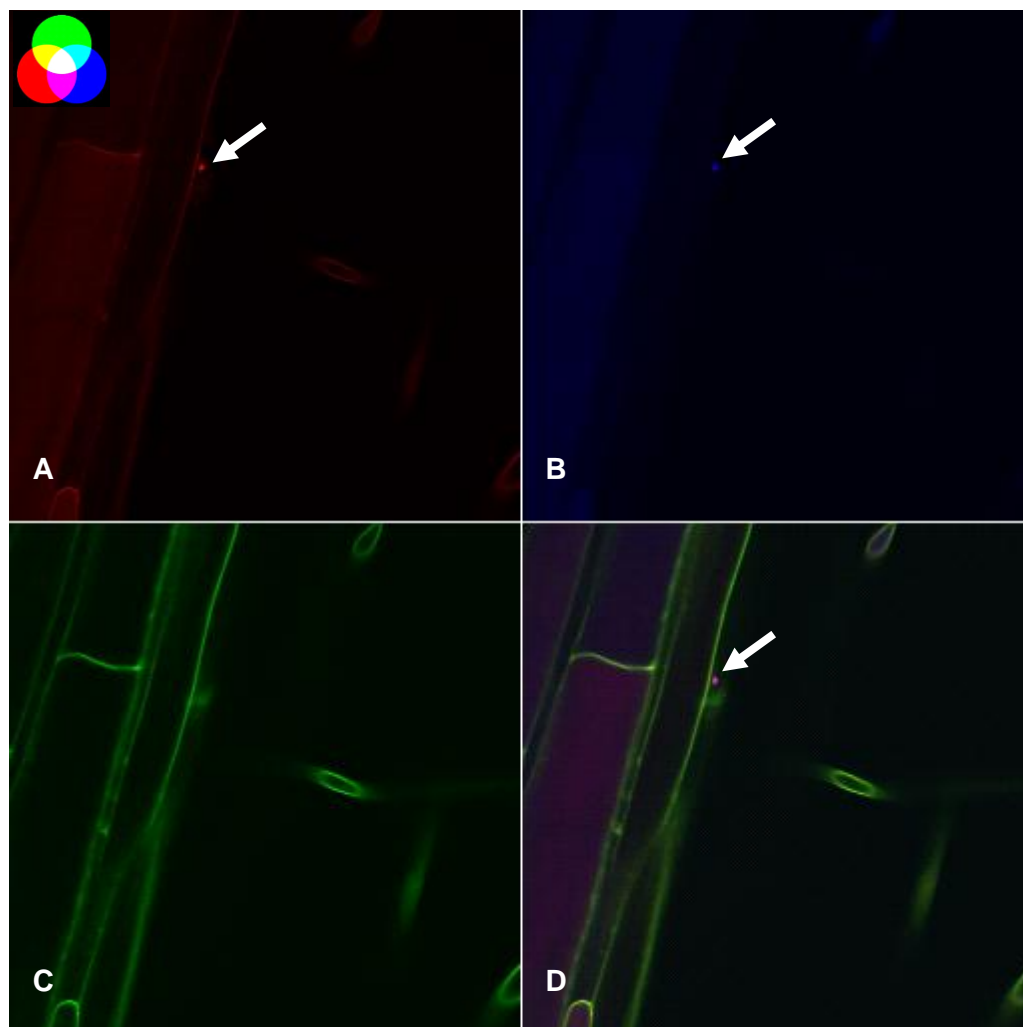


Figura 18 Hibridização fluorescente *in situ* de raízes de trigo após 7 dias de inoculação com *A. brasilense* FP2 em condições estéreis. As sondas Abras1420 contendo o fluoróforo Cy3 (vermelho) e EUBmix contendo o fluoróforo Cy5 (azul) foram utilizadas. A amostra foi visualizada nos comprimentos de onda de 543, 488 e 365 nm para as fluorescências vermelha (A), verde-autofluorescência da clorofila (C) e azul (B), respectivamente. A Figura D mostra a sobreposição de todas as fluorescências.

O método de hibridização *in situ* também foi utilizado para estudar a interação de *A. brasilense* com trigo variedade Schöndorfer cultivado sob condições não estéreis em casa de vegetação. Na Figura 19 pode-se observar um número bem maior de outras bactérias em comparação com *A. brasilense* e também um

aglomerado de células de *A. brasilense* imerso em um biofilme contendo outras bactérias indicando uma possível interação entre elas. Esta técnica é bastante útil no monitoramento de bactérias inoculadas e sua interação com a microbiota da planta. Oliveira e colaboradores (2009) observaram que a técnica de FISH foi adequada para acompanhar espécies específicas de bactérias durante o início da colonização de mudas de cana em inóculos misto de diferentes espécies bacterianas. Assim, demonstrando que esta técnica é uma ferramenta útil para definir a melhor composição de inóculos contendo bactérias promotoras de crescimento vegetal para cana-se-açúcar e outras gramíneas.

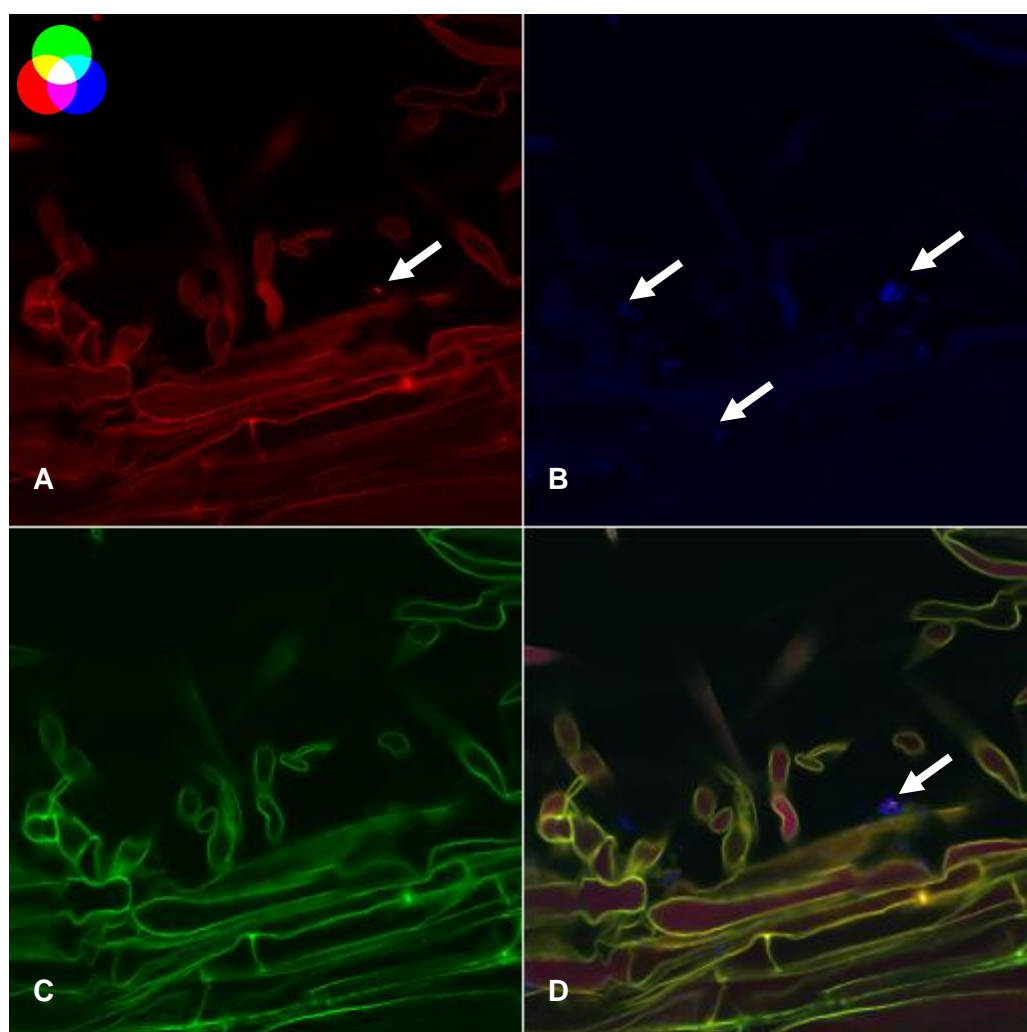


Figura 19 Hibridização fluorescente *in situ* de raízes de trigo após 7 dias de inoculação com *A. brasilense* FP2 em condições não estéreis. As sondas Abras1420 contendo o fluoróforo Cy3 (vermelho) e EUBmix contendo o fluoróforo Cy5 (azul) foram utilizadas. A amostra foi visualizada nos comprimentos de onda de 543, 488 e 365 para as fluorescências vermelha (A), verde-autofluorescência da clorofila (C) e azul (B), respectivamente. A Figura D mostra a sobreposição de todas as fluorescências.

Nas Figuras 20 e 21 é mostrada a hibridização fluorescente *in situ* de plantas controle não inoculadas dos experimentos em condições não estéreis e estéreis, respectivamente. Nas raízes de plantas não inoculadas em condições não estéreis não foi possível observar *A. brasilense* indicando ausência desta bactéria. Nas amostras de raízes não inoculadas em condições estéreis não foi observada a presença bactérias.

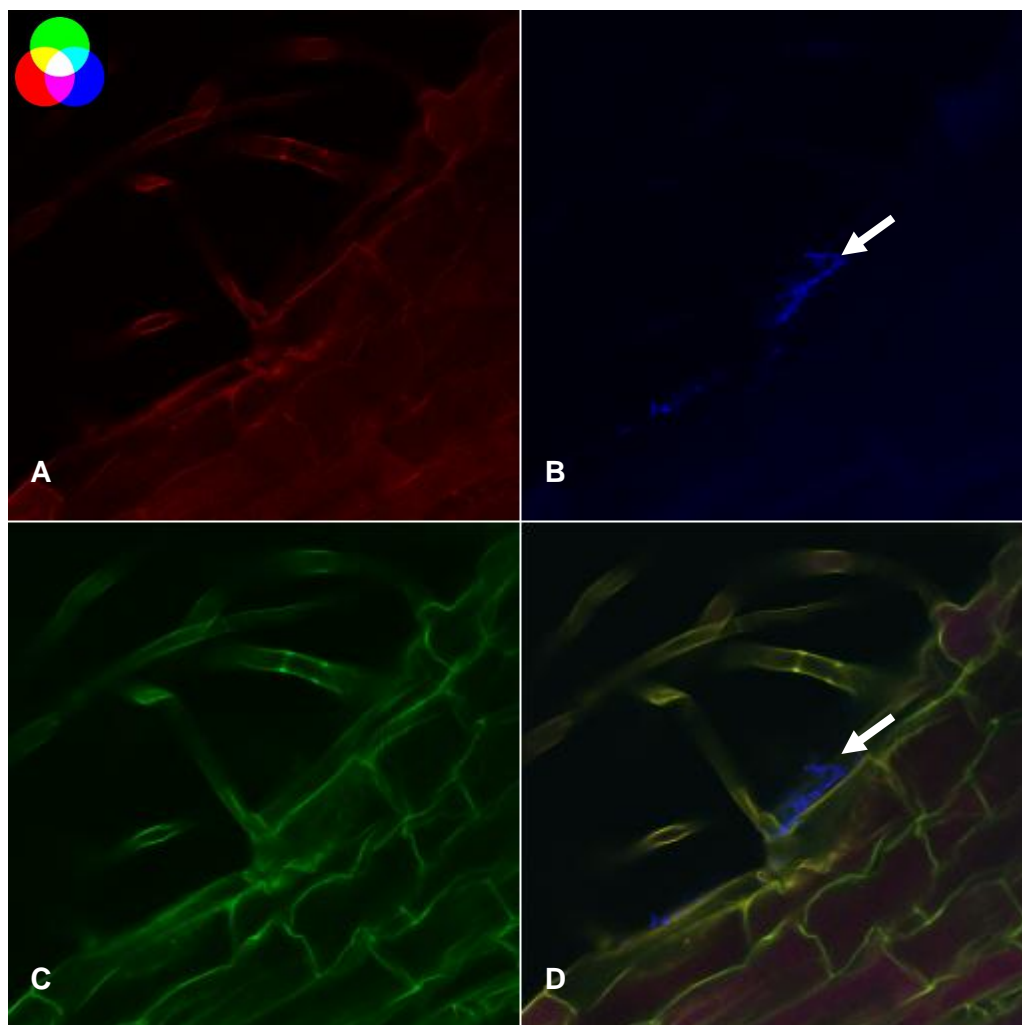


Figura 20 Hibridização fluorescente *in situ* de raízes de trigo não inoculadas em condições não estéreis. As sondas Abras1420 contendo o fluoróforo Cy3 (vermelho) e EUBmix contendo o fluoróforo Cy5 (azul) foram utilizadas. A amostra foi visualizada nos comprimentos de onda de 543, 488 e 365 para as fluorescências vermelha (A), verde-autofluorescência da clorofila (C) e azul (B), respectivamente. A Figura D mostra a sobreposição de todas as fluorescências.

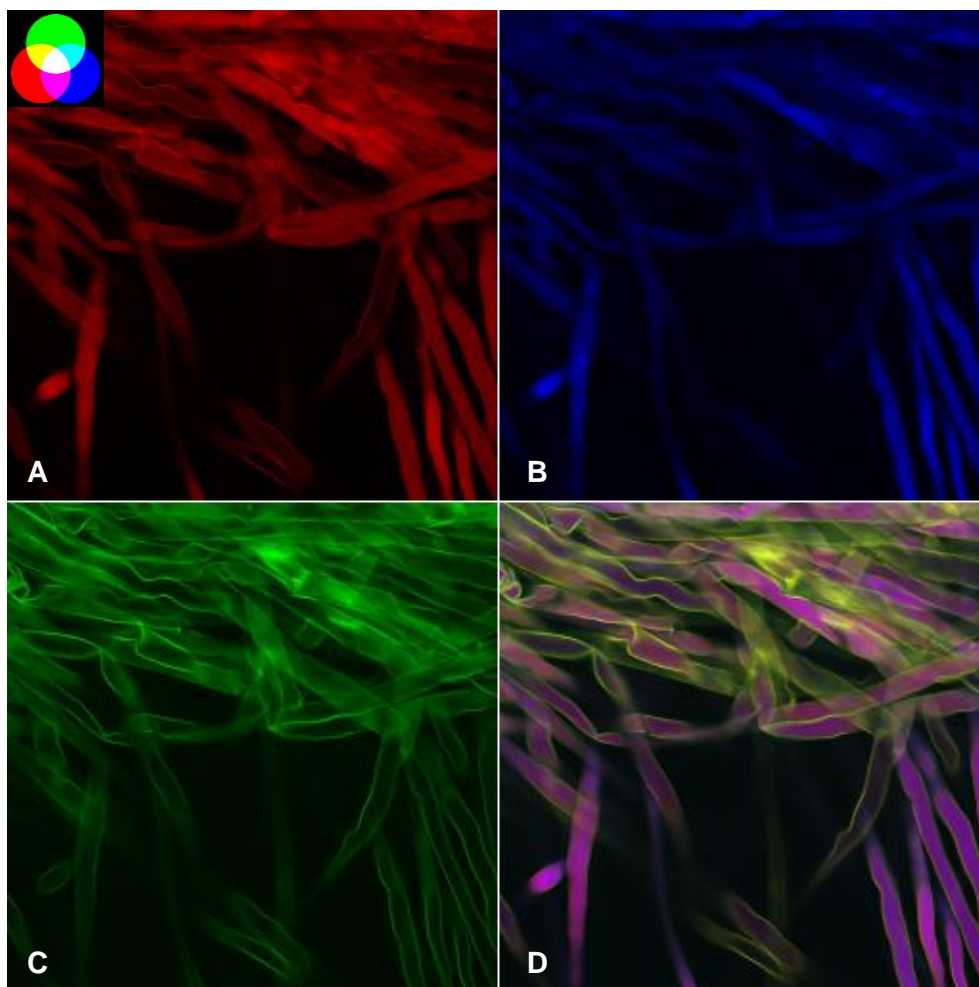


Figura 21 Hibridização fluorescente *in situ* de raízes de trigo não inoculadas em condições estéreis. As sondas Abras1420 contendo o fluoróforo Cy3 (vermelho) e EUBmix contendo o fluoróforo Cy5 (azul) foram utilizadas. A amostra foi visualizada nos comprimentos de onda de 543, 488 e 365 para as fluorescências vermelha (A), verde-autofluorescência da clorofila (C) e azul (B), respectivamente. A Figura D mostra a sobreposição de todas as fluorescências.

Os resultados mostraram que a técnica de hibridização fluorescente *in situ* é valiosa para o monitoramento de *A. brasilense* durante a colonização de trigo, sendo possível observar a distribuição espacial das bactérias diretamente na raiz. Os resultados obtidos são semelhantes aos discutidos na literatura (ASSMUS et al., 1995; AMANN e LUDWIG, 2000; DAIMS et al., 2001; ROTHBALLER et al., 2003). Porém, a quantificação direta de microrganismos em amostras microbianas estruturadas utilizando a abordagem do FISH é dificultada pelo fato das células estarem agregadas dificultando a detecção de células únicas. Deste modo, utilizamos a técnica de qPCR para a quantificação do número de células de *A. brasilense* FP2 em trigo inoculado.

11 CONCLUSÕES

Com os resultados deste capítulo pode-se concluir que:

- O método de desinfestação da semente utilizado não interfere no crescimento da planta e a adição de PVP ajuda na adesão das células de *A. brasilense* FP2 na semente;
- Foi possível observar a bactéria inoculada em raízes de trigo em condições estéreis e não estéreis utilizando a técnica de hibridização *in situ* Fluorescente FISH;

CAPÍTULO 03: MONITORAMENTO DE *Azospirillum brasilense* FP2 INOCULADO EM TRIGO UTILIZANDO qPCR

12 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

12.1 Quantificação de microrganismos em amostras ambientais utilizando PCR quantitativa (qPCR)

O uso de inoculantes contendo *A. brasilense* em países latino-americanos tem aumentado nos últimos anos, atingindo em 2007 cerca de 500.000 hectares de trigo e milho (CASTRO-SOWINSKI et al. 2007). Por outro lado o *Azospirillum* nem sempre sobrevive bem no solo ou o rizosfera (BASHAN et al., 1995; BASHAN 1999), o que pode afetar o desempenho do inoculante (DOBBELAERE et al., 2002). A colonização eficaz das raízes é um pré-requisito para o sucesso da estimulação por *Azospirillum*, porém, o monitoramento por métodos dependentes e independentes de cultivo são ineficientes, o que significa que os muitos casos de falha de inoculação permanecem inexplicados (COUILLEROT et al., 2010b).

A utilização de técnica de PCR quantitativa, tais como NMP-PCR e PCR competitiva e uma abordagem promissora para quantificar cepas microbianas individuais em ambientes complexos (ROSADO et al., 1996;. MAUCHLINE et al., 2002). Recentemente, PCR em tempo real tem sido o método escolhido para quantificar populações da rizosfera porque permite alta especificidade, sensibilidade e velocidade (SØRENSEN et al., 2009; COUILLEROT et al., 2010a,b). No entanto, na rizosfera a PCR em tempo real só foi utilizada até agora para a quantificação dos grupos bacterianos nativos/naturais (MAVRODI et al., 2007) e sua aplicabilidade para monitorar cepas bacterianas inoculadas continua a ser avaliado.

A metodologia de PCR em tempo real consiste em acompanhar o número de cópias de um fragmento de DNA produzido na reação de PCR a cada ciclo. O número de cópias é proporcional à fluorescência que pode ser oriunda da liberação (e ativação) de um fluorocromo preso a uma sonda específica (método TaqMan) ou pelo intercalamento (e aumento de fluorescência) de moléculas fluorescentes nos produtos de PCR formados (método SYBR Green). Uma vez feita a amplificação, um limite de fluorescência (na fase exponencial da amplificação) é estipulado de forma a determinar o ciclo em que cada amostra alcança este limite de detecção, chamado de Ct (*Cycle Threshold*) (FADERL, HOCHHAUS, HUGHES, 2004).

Mavrodi e colaboradores (2007) demonstraram o potencial da PCR em tempo real para quantificação direta e caracterização de estirpes de *Pseudomonas fluorescens* produtoras de 2,4-diacetilfluoroglucinol em amostras de rizosfera de trigo. Couillerot e colaboradores (2010a) desenvolveram um método de PCR em tempo real para a quantificação de *Azospirillum lipoferum* CRT1 na rizosfera de milho em condições de casa de vegetação e campo. Para o desenvolvimento deste método foi necessário intensivo trabalho para conseguir especificidade de detecção e eficiência de amplificação, visto que amostras de DNA extraídas de solo geralmente contêm grandes quantidades de inibidores de PCR, como os ácidos húmicos.

13 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a persistência da população de *Azospirillum brasilense* FP2 inoculado em trigo utilizando qPCR sob condições de casa de vegetação;

14 MATERIAIS E MÉTODOS

14.1 Desenho de oligonucleotídeos iniciadores para quantificação e monitoramento da estirpe inoculada por qPCR

Oligonucleotídeos foram desenhados a partir da sequência incompleta do genoma da bactéria *Azospirillum brasilense* FP2. A seleção dos oligonucleotídeos foi baseada nos seguintes critérios: (i) um produto amplificado não superior a 100 pb, e (ii) oligonucleotídeos com 18-22 pb de comprimento. O programa “Primer Express 3.0” (Applied Biosystems, Foster City, CA) foi utilizado para analisar as características dos oligonucleotídeos.

Os oligonucleotídeos foram selecionados com base na (i) amplificação bem-sucedida utilizando o DNA genômico da estirpe FP2 como molde e (ii) ausência de reação cruzada com cepas não-alvo sob condições de PCR qualitativa. Os testes foram conduzidos em termociclador Eppendorf Master Cycler Gradient. As reações continham 10-50 ng de DNA molde, 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 1 U de enzima Taq DNA polimerase (Dream Taq Invitrogen Inc.), tampão de reação para a respectiva enzima Taq DNA polimerase 10x, 200 µmol/L de desoxiribonucleotídeos e água ultra pura estéril para um volume de final de 10 µL.

14.2 Inoculação de trigo com *Azospirillum brasilense* FP2 sob condições de casa de vegetação

Estes experimentos foram conduzidos no instituto Helmholtz Zentrum em Munique na Alemanha durante o estágio sanduíche de 7 meses, sob a supervisão do professor Dr. Anton Hartmann.

Em todos os experimentos realizados, a superfície de sementes de trigo cultivar Schöndorfer foram desinfestadas superficialmente utilizando protocolo descrito na seção 4.3.2 de Materiais e Métodos. As sementes foram germinadas em placas contendo meio ágar nutriente (Fluka Analytical) por 3 dias, transferidas para tubos de ensaio contendo 16 mL de solução de Hoagland e pérolas de quartzo de aproximadamente 3 mm de diâmetro e então incubadas em câmara de cultivo com 14h luz/10h escuro, temperatura de 23°C e umidade superior a 50% por 24 horas. Para os experimentos em condições não estéreis, solo comprado em agropecuária

foi suspenso em Hoagland a 1% (p/v), filtrado e esta solução foi adicionada às pérolas de quartzo. Nos experimentos com a presença de outras bactérias diazotróficas, foram co-inoculados *A. brasilense* NH, *Herbaspirillum seropedicae* Z67, *Gluconacetobacter diazotrophicus* DSM 5601 e *A. lipoferum* DSM 1691 juntamente com *A. brasilense* FP2. O controle consistiu de plantas inoculadas com os competidores mas não com *A. brasilense* FP2. Todos os microrganismos foram crescidos até a concentração de aproximadamente 10^9 células.mL⁻¹, as células foram lavadas 1x com tampão PBS (AppliChem). Em todos os experimentos, foi inoculado aproximadamente 10^7 células de microrganismo/planta no meio de cultura das plantas e incubadas por quatorze dias. Para determinar o número de unidades formadoras de colônias, as culturas crescidas foram diluídas (10^{-1} até 10^{-7}), plaqueadas em NFbHPN e contadas pela técnica da micro-gota. Os experimentos foram realizados em triplicatas biológica e técnica e as amostras foram coletadas a cada 2 dias, o controle negativo consistiu de plantas não inoculadas.

14.3 Coleta das amostras e análises

A cada 2 dias foram coletadas as amostras de plantas e foram realizadas análises do peso fresco da raiz e parte aérea e contagem do microrganismo inoculado em meio NFbHPN, conforme item 4.4.2 descrito anteriormente. As raízes foram também maceradas utilizando nitrogênio líquido para posterior extração de DNA.

14.4 Extração de DNA

Aproximadamente 100 mg de raízes de trigo maceradas em nitrogênio líquido foram usadas para extração de DNA com o Fast DNA Spin kit (MPbio). Este kit permite a extração de DNA tanto de planta quanto de bactéria e foi utilizado em todas as extrações de DNA (planta e bactéria) desta etapa.

14.5 PCR quantitativo (qPCR)

As reações de PCR em tempo real foram conduzidas em um equipamento Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Como sistema de detecção foi utilizado o SYBR Green (Power SYBR® Green PCR Master Mix, Applied Biosystems), um reagente que emite fluorescência ao se ligar inespecificamente a qualquer dupla fita de DNA. Todos os experimentos de quantificação foram realizados com triplicatas biológicas, e cada uma destas com

triplicatas técnicas. Antes de realizar a quantificação, cada oligonucleotídeo foi testado por PCR convencional para estabelecer as condições ótimas da reação. Posteriormente, para cada oligonucleotídeo foi determinada a curva de eficiência. Para isto, um par de oligonucleotídeos (1 mmol/L final) foi utilizado em reações com o DNA na concentração original e nas diluições 1:10, 1:100 e 1:1000. A curva gerada neste procedimento indica a eficiência de reação daquele determinado oligonucleotídeo naquela amostra, nos permitindo garantir que a quantificação será válida na faixa testada.

Como o marcador SYBR Green se liga a dupla fita de DNA inespecificamente, a análise do branco de reação (não contendo DNA) permite determinar a temperatura de fusão (T_m , do inglês *melting temperature*) do dímero de oligonucleotídeo formado na ausência de amplificação. Essa temperatura nos permite avaliar, após cada experimento, se a reação produziu o resultado esperado para aquele determinado par de oligonucleotídeos. A reação foi feita em placas de 96 poços (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, da empresa Applied Biosystems). Em cada poço foram colocadas 6,25 μ L de DNA molde (diluído em água ultra pura estéril), 12,5 μ L da solução mix do kit SYBR Green e 6,25 μ L de uma mistura dos dois oligonucleotídeos para a concentração final de 1 mmol/L.

O programa ABI Prism 7500 Sequence Detection versão 1.2.3 (Applied Biosystems) acompanha a reação de PCR em tempo real, gerando um gráfico correspondente ao logaritmo do valor da fluorescência medida em cada poço pelo número do ciclo correspondente. Uma linha de corte de intensidade de fluorescência (denominada *threshold*) é definida em um ponto onde todas as curvas (considerando todas as replicatas do experimento) estejam em sua fase exponencial. O ciclo do PCR no qual a curva de amplificação cruza a linha de corte é denominado C_t (ciclo *threshold*). De acordo com a quantidade de DNA alvo presente em cada amostra analisada, um número maior ou menor de ciclos ocorrerá para que sua curva de amplificação alcance a linha de corte (*threshold*). Deste modo, amostras com pouco DNA alvo apresentarão um C_t elevado, enquanto amostras com maior concentração de DNA alvo apresentarão um C_t mais baixo.

As reações foram realizadas nas seguintes condições: 95 °C por 10 minutos e 40 ciclos de duas temperaturas: 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto, seguido de uma curva de desnaturação.

14.6 Curva de calibração de DNA

Para simular as condições encontradas durante a extração de DNA das plantas inoculadas, foi construída uma curva de calibração utilizando 100 mg de raízes de trigo maceradas com nitrogênio líquido e adicionado 10^2 a 10^7 UFC de *A. brasilense*. A mistura foi incubada por 30 minutos á temperatura ambiente para propiciar as interações entre as partículas da raiz e a bactéria e então o DNA foi extraído e utilizado nas análises de qPCR.

14.7 Análises dos dados

Os dados de cada metodologia utilizada para contagem da bactéria inoculada foram avaliados pelo teste T e por ANOVA, em um nível de 95% de confiança.

15 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo final do desenvolvimento desta técnica é sua aplicação para o monitoramento da estirpe inoculada sob condições de cultivo em campo. Para tanto, foram desenhados e testados oligonucleotídeos iniciadores estirpe-específicos e estes foram utilizados para a quantificação de *A. brasilense* FP2 em condições estéreis, não estéreis e na presença de outras bactérias diazotróficas.

15.1 Desenho de oligonucleotídeos iniciadores e avaliação da eficiência de amplificação

Oligonucleotídeos foram desenhados a partir da sequência incompleta do genoma da bactéria *Azospirillum brasilense* FP2. Regiões de aproximadamente 300-400 pb foram visualizadas e manualmente escolhidas utilizando o *programa* Artemis (RUTHERFORD, 2000). A Figura 22 mostra uma das regiões escolhida (em rosa) para ser alvo dos oligonucleotídeos.

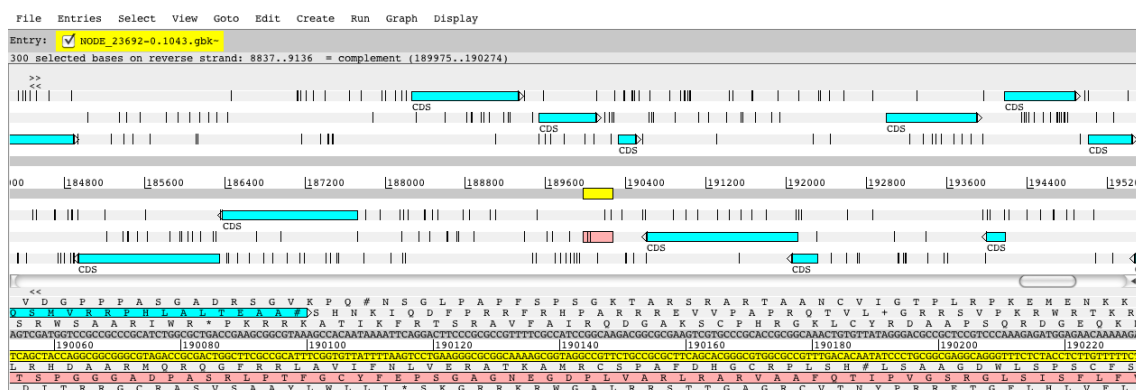


Figura 22 Localização de uma região selecionada (indicada em rosa) para ser alvo de oligonucleotídeos para a quantificação de *Azospirillum brasilense*.

O programa “Primer Express 3.0” (Applied Biosystems, Foster City, CA) foi utilizado para analisar as características dos três pares de oligonucleotídeos selecionados (Tabela 09).

Tabela 09 Oligonucleotídeos específicos para *Azospirillum brasilense*

Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência	Tamanho do amplicon
Azo-1	Forward CGACTTCGCGCCGTCTT Reverse GCGTAAAGCCACAATAAAATTCAG	70
Azo-2	Forward GCGCGGGAAGTCCTGAAT Reverse CCCTTCACCATCCAGTCGAT	90
Azo-3	Forward TCCTGAATTTTATTGTGGCTTTACG Reverse CCCTTCACCATCCAGTCGAT	80

Os oligonucleotídeos foram avaliados considerando: (i) amplificação bem-sucedida utilizando o DNA genômico da estirpe FP2 como molde e (ii) ausência de reação cruzada com cepas não-alvo sob condições de PCR qualitativa. Duas misturas do DNA genômico de bactérias e 3 estirpes de *Azospirillum brasilense* foram utilizados como controle negativo: 1- mistura de DNA de *Herbaspirillum* sp. contendo *H. seropedicae* Z67, *H. huttiense* IAM 15032 e *H. hiltneri* HILTI; 2- mistura de DNA de *Bradyrhizobium* sp. contendo *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 586, *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5032 e *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 5019; E mais 3 estirpes de *Azospirillum brasilense* SF9, FP0 e IC26. As condições de PCR utilizadas estão descritas na seção 4.7.1 Materiais e Métodos.

Na Figura 23 estão mostrados os resultados do teste dos oligonucleotídeos específicos para o DNA de *A. brasilense*. O par Azo-1 não apresentou amplificação positiva na região esperada para a estirpe alvo e ainda apresentou amplificações inespecíficas para a mistura de DNA de *Herbaspirillum* sp., mistura de DNA de *Bradyrhizobium* sp. e a estirpe FP0 de *A. brasilense*. O par Azo-2 apresentou-se o mais específico dentre os oligonucleotídeos testados, mostrando amplificação positiva para a estirpe alvo na região esperada e não apresentando amplificação nos controles, exceto para a estirpe de *A. brasilense* FP0 que pode ser justificada pela grande similaridade entre esta estirpe e a estirpe FP2, visto que o FP2 é um mutante espontâneo desta estirpe, resistente a estreptomicina e ácido nalidíxico. O par Azo-3 apresentou amplificação positiva para a estirpe alvo, porém permitiu amplificação inespecífica para as misturas de DNA de *Herbaspirillum* sp. e *Bradyrhizobium* sp.

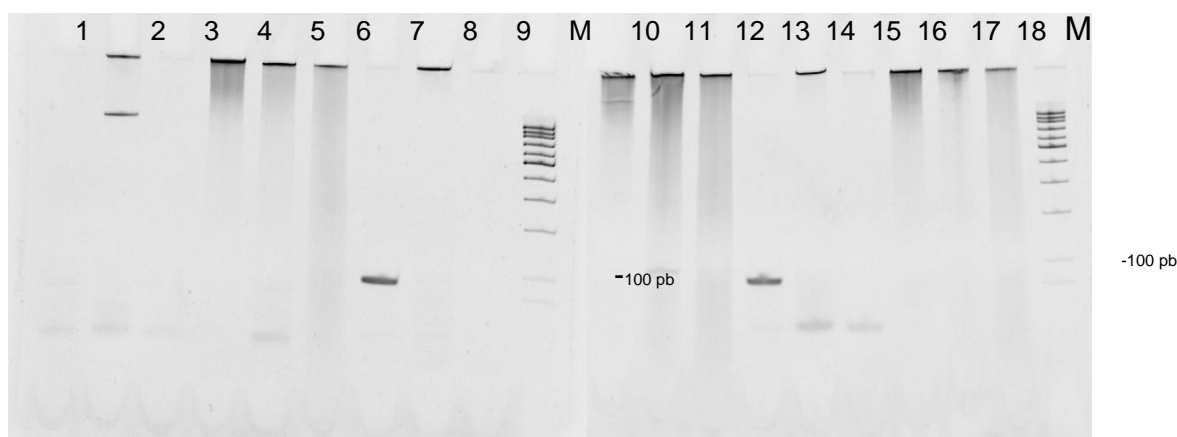


Figura 23 Teste de especificidade dos oligonucleotídeos para *Azospirillum brasilense* FP2. Lanes 1 a 6: iniciador Azo-1 testado em *A. brasilense* FP2, mistura de DNA genômico *Herbaspirillum* sp, mistura de DNA genômico de *Bradyrhizobium* sp, *Azospirillum brasilense* estirpes SF9, FP0 e IC26, respectivamente. Lanes 7 a 12: iniciador Azo-2 testado em *A. brasilense* FP2, mistura de DNA genômico *Herbaspirillum* sp, mistura de DNA genômico de *Bradyrhizobium* sp, *Azospirillum brasilense* estirpes SF9, FP0 e IC26, respectivamente. Lanes 13 a 18: iniciador Azo-3 testado em *A. brasilense* FP2, mistura de DNA genômico *Herbaspirillum* sp, mistura de DNA genômico de *Bradyrhizobium* sp, *Azospirillum brasilense* estirpes SF9, FP0 e IC26, respectivamente. M: marcador de pares de base 1 Kb.

O teste de especificidade do oligonucleotídeo Azo-2 foi repetido utilizando diferentes estirpes de *Azospirillum brasilense* e diferentes espécies dos gêneros *Azospirillum* e *Roseomonas* da coleção do instituto Helmholtz Zentrum em Munique na Alemanha. As condições de PCR utilizadas estão descritas na seção 4.7.1 Materiais e Métodos.

Neste novo teste o Azo-2 amplificou todas as estirpes de *A. brasilense* testadas (Figura 24), demonstrando que este oligonucleotídeo não é específico para a estirpe FP2. Porém, tem potencial para ser utilizado no monitoramento da população total de *A. brasilense* na amostra.

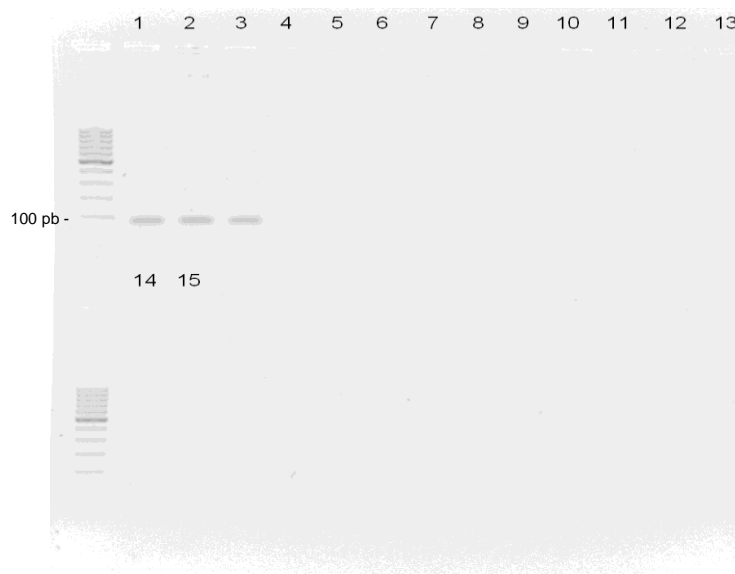


Figura 24 O oligonucleotídeo Azo-2 usado neste estudo foi testado contra vários DNAs bacterianos: 1- *A. brasilense* FP2; 2- *A. brasilense* NH; 3- *A. brasilense* SP245; 4- *A. brasilense* SP7; 5- *A. lipoferum* DSM1691; 6- *A. canadense* LMG23617; 7- *A. rugosum* DSM19657; 8- *A. irakiense* DSM11586a; 9- *A. amazonense* DSM2787; 10- *Roseomonas genomospecies* 6 ccuG33010; 11- *Roseomonas fauriae* KAcc11694; 12- *Burkholderia tropica* PPE5; 13- *Burkholderia brasiliensis* M171; 14- DNA de trigo; 15- Controle negativo.

Para que uma região estirpe-específica para o *A. brasilense* FP2 fosse encontrada, fez-se o alinhamento global do genoma da estirpe SP245 e o genoma incompleto da estirpe FP2. O alinhamento foi visualizado e as regiões não alinhadas foram manualmente escolhidas utilizando o *programa* Artemis (RUTHERFORD, 2000). Porém, a busca pelas regiões não alinhadas não foi eficiente utilizando esta técnica, devido ao tamanho do alinhamento e o genoma da estirpe FP2 estar incompleto.

Uma nova seleção de oligonucleotídeos foi feita fragmentando *in silico* a sequência genômica de *A. brasilense* FP2 em fragmentos de 500pb aleatoriamente e comparando estes fragmentos com sequências depositadas no banco de dados NCBI. As sequências com identidade menor que 6% com sequências do banco foram escolhidas para desenho de oligonucleotídeos. Seis regiões intergênicas e codificadoras do genoma de *A. brasilense* FP2 foram escolhidas (Figura 25) e um total de 10 pares de oligonucleotídeos foram desenhados e testados contra o DNA

de 13 diferentes bactérias incluindo outras estirpes de *A. brasilense* e espécies de *Azospirillum* filogeneticamente próximas.

Do total de 10 pares desenhados, cinco deles foram específicos para o *A. brasilense* FP2, sendo que o produto amplificado de dois deles (AzoR2.1 e AzoR2.2) está localizado numa região que codifica para uma proteína hipotética (Figura 25-A) e o produto amplificado de três deles (AzoR5.1, AzoR5.2 e AzoR5.3) pertencente a uma região intergênica próxima ao gene que codifica para uma DNA invertase (Figura 25-B). Na Figura 26 está mostrado o resultado da amplificação de 6 pares de oligonucleotídeos. Os primeiros foram específicos para a estirpe e o último, AzoR6.1, amplificou também DNA de *A. brasilense* NH e *A. brasilense* SP245, portanto, não sendo utilizado nos próximos testes. O oligonucleotídeo para o gene 16S rRNA foi utilizado como controle positivo da amplificação demonstrando que o DNA das bactérias utilizadas não continha inibidor da PCR.

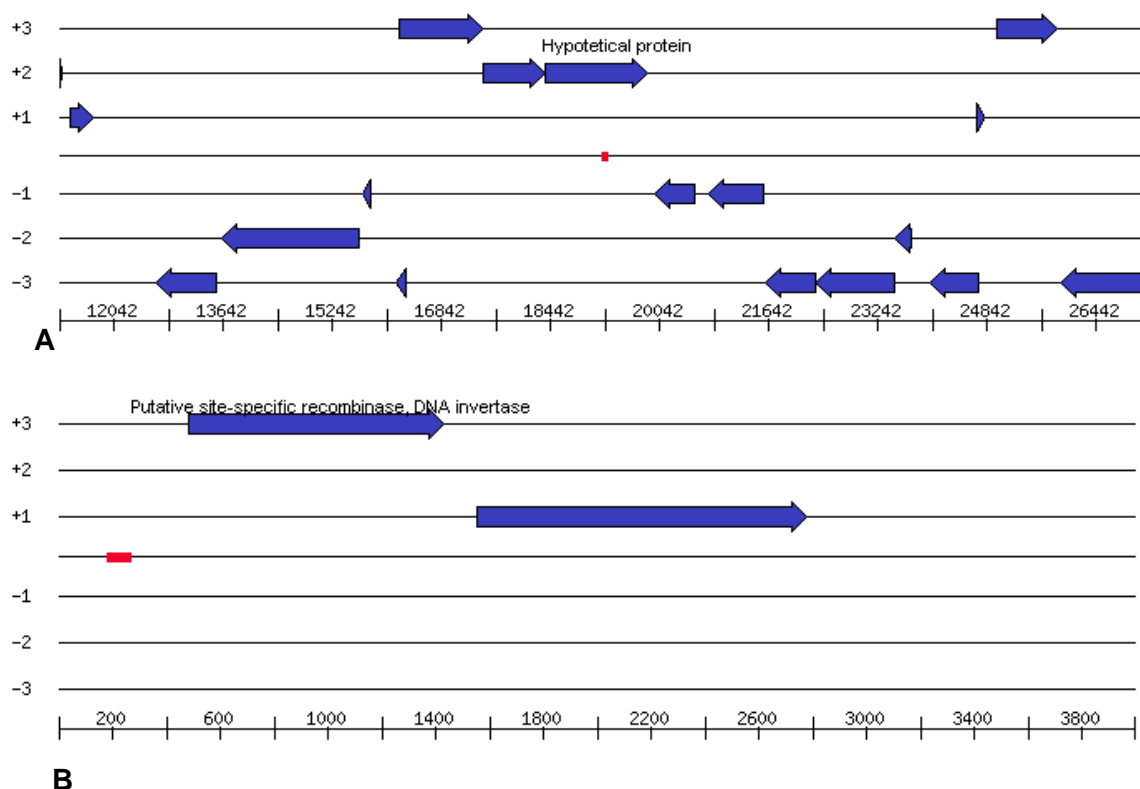


Figura 25 Regiões utilizadas para o desenho de oligonucleotídeos específicos para *A. brasilense* FP2. O produto amplificado está marcado em vermelho, as regiões foram visualizadas utilizando o servidor RAST (AZIZ et al., 2008). A: região onde foram desenhados os oligonucleotídeos AzoR2.1 e AzoR2.2, B: região dos oligonucleotídeos AzoR5.1, AzoR5.2 e AzoR5.3.

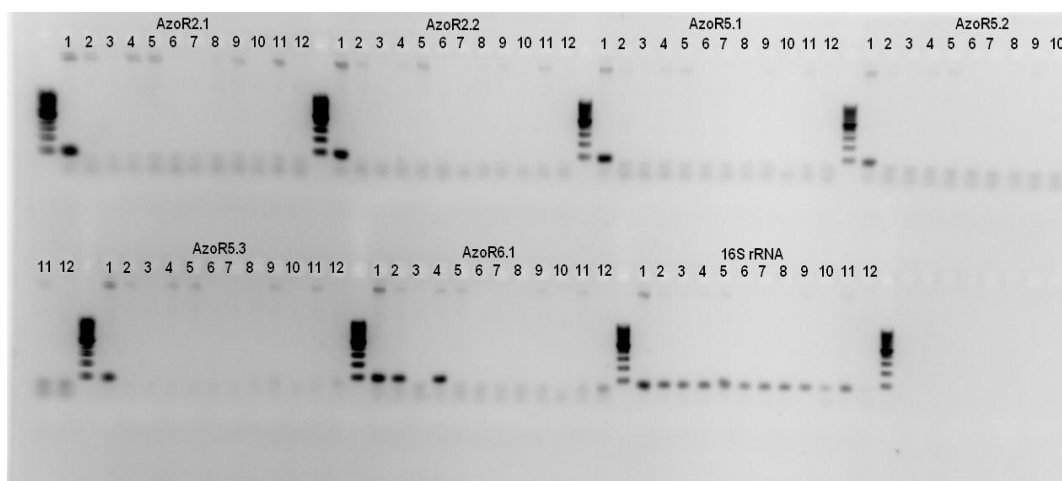


Figura 26 Teste de especificidade de seis oligonucleotídeos desenhados para *A. brasilense* FP2. 1- *A. brasilense* FP2, 2- *A. brasilense* NH, 3- *A. brasilense* SP7, 4- *A. brasilense* SP245, 5- *A. lipoferum*, 6- *A. rugosum*, 7- *A. canadense*, 8- *A. amazonense*, 9- *A. irakiense*, 10- *Roseomonas genomespecies* 6, 11- *Roseomonas fauriae*, 12- Controle negativo. O oligonucleotídeo para o gene 16S rRNA foi utilizado como controle positivo da amplificação

A Tabela 10 lista os oligonucleotídeos estirpe específicos utilizados nesse trabalho, mostrando a sequência de nucleotídeos de cada um deles. As reações foram realizadas nas seguintes condições: 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de duas temperaturas: 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto, seguido de uma curva de desnaturação.

Tabela 10 Oligonucleotídeos específicos para *Azospirillum brasilense* FP2 utilizados neste trabalho

Oligonucleotídeo	Sequência	Tamanho do amplicon
AzoR2.1	Forward CGCCACCATGCGATCAA Reverse GCATGCCCAGTACTGCAAGTC	90
AzoR2.2	Forward CCTTCACCTGGACGGTTCAG Reverse CGCGGCCAGCAGACTT	90
AzoR5.1	Forward GATCACTGGACTCGGCTGTCA Reverse ATCGACCGTTCTCAGCGTCTA	90
AzoR5.2	Forward TCACTGGACTCGGCTGTCAA Reverse ATATCGACCGTTCTCAGCGTCTA	90
AzoR5.3	Forward AATTCTTTCCGTTGGCTTTCAA Reverse GCTTGCCGACCGGAGTATC	90

A eficiência dos oligonucleotídeos foi testada em uma curva padrão de concentração crescente conhecida de DNA de *A. brasilense* FP2 utilizando a técnica de PCR em tempo real. Os resultados estão apresentados na Tabela 11.

A eficiência (E) da amplificação é fundamental para o sucesso da técnica. Esta deve variar idealmente entre os 90% e 100%, o método de determinação da eficiência baseia-se na equação: $E = 10^{(-1/\text{inclinação})} - 1$. A eficiência da amplificação pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo o comprimento do amplicom, existência de estruturas secundárias no DNA molde da amostra, qualidade dos oligonucleotídeos usados, procedimentos laboratoriais incorretos, presença ou utilização de inibidores da PCR, presença ou utilização de promotores da PCR, entre outros (MA et al., 2006).

Após amplificação do DNA é necessário quantificá-lo. A técnica da PCR em tempo real permite que a quantificação do DNA possa ser realizada de forma absoluta ou relativa. Na quantificação absoluta determina-se o número exato de moléculas (número de cópias de DNA ou nanogramas de DNA). Trata-se de um método de determinação da concentração do DNA em uma dada amostra de concentração desconhecida a partir de uma curva padrão obtida após análises de amostras de concentração conhecida. Para tal, o valor de Ct (de uma dada amostra de concentração desconhecida) é projetado na curva padrão x logaritmo da concentração de DNA e a partir da qual se determina a concentração de DNA da amostra em questão (MA et al. 2006).

Tabela 11 Eficiência dos oligonucleotídeos específicos para *A. brasilense* FP2 Nome do oligonucleotídeo, R² da curva padrão de eficiência, Inclinação da reta da curva padrão e a eficiência de amplificação de cada um dos oligonucleotídeos utilizados nesse trabalho. A eficiência foi calculada utilizando a fórmula $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ e %E = (E - 1) * 100.

Oligonucleotídeo	R ²	Inclinação	Eficiência	
			(E)	(%E)
Azo-2	0,9934	3,4	1,97	96,8
AzoR2.1	0,9980	3,3	2,01	101,3
AzoR2.2	0,9982	3,5	1,94	94,0
AzoR5.1	0,9977	3,7	1,88	87,6
AzoR5.2	0,9996	3,6	1,89	88,8
AzoR5.3	0,9995	3,4	1,96	96,3

Neste trabalho, foi utilizado o oligonucleotídeo Azo-2 para quantificar a população de *A. brasilense* e foram escolhidos mais 3 oligonucleotídeos dentre os específicos para a estirpe FP2, de acordo com a maior eficiência de amplificação (AzoR2.1, AzoR2.2 e AzoR5.3). Para a quantificação de bactérias totais foi utilizado um primer para o gene 16S rRNA (Forward TCGCTAGTAATCGCGGATCA, Reverse TGTGACGGGCGGTGTGTA), cedido por Doumit Camilios Neto.

Estes oligonucleotídeos foram utilizados para quantificar o *A. brasilense* FP2 inoculado em trigo primeiramente em condições estéreis. Em plantas não inoculadas não foi detectado *A. brasilense* por esta técnica.

Uma curva padrão (Figura 27) foi construída tentando simular as condições experimentais. Esta curva foi construída utilizando 100 mg de macerado de raízes de trigo (sem bactéria), adicionado uma suspensão contendo de 10² a 10⁷ UFC/mL de *A. brasilense* e então o DNA foi extraído e utilizado nas análises de qPCR. A curva foi gerada plotando o Ct contra o logaritmo do número de bactérias adicionada em cada ponto da curva. A equação da reta da curva foi utilizada para estimar a quantidade de bactéria nas raízes de trigo inoculado com *A. brasilense* FP2.

O limite de detecção da técnica foi de 10⁴ UFC/g (Unidades Formadoras de Colônias por grama) de raiz de trigo. Couillerot et al., (2010b) desenvolvendo um método baseado em qPCR para quantificar *A. lipoferum* CRT1 em milho encontraram o mesmo limite de detecção e observaram que a presença de extrato

de raiz diminuiu o limite de detecção da técnica. Isto significa que a inclusão do extrato de raiz na construção da curva permitiu integrar o *background* do DNA da planta, que é observado na condição experimental, no limite de sensibilidade da técnica, conseqüentemente, tornando a quantificação mais próxima da realidade.

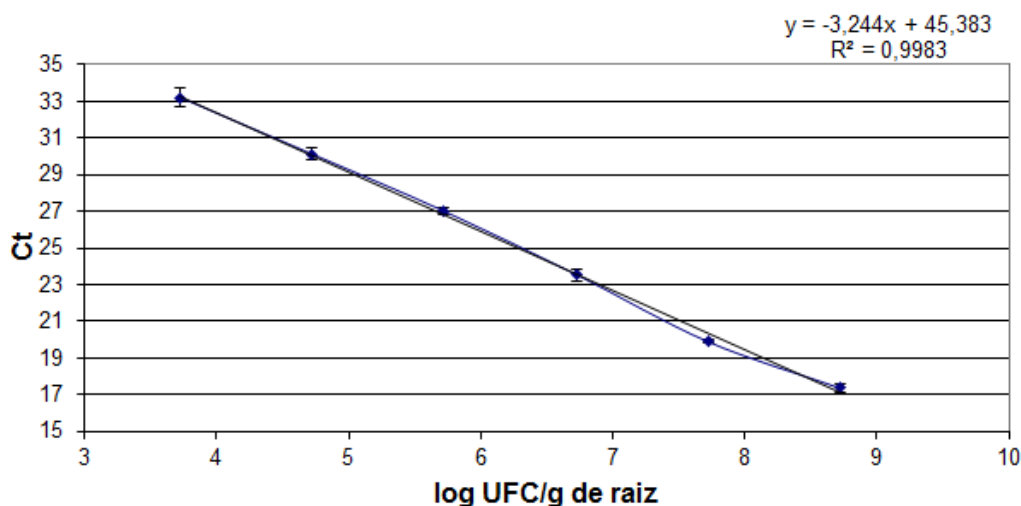


Figura 27 Curva padrão de qPCR relacionando o número de células de *A. brasilense* ao valor de Ct.

15.2 Quantificação de *A. brasilense* FP2 colonizando raízes de trigo em condições estéreis

Para a quantificação de *A. brasilense* FP2 em condições estéreis, as sementes foram desinfestadas, inoculadas, coletadas nos períodos indicados e o DNA extraído como no item 4.7.1.3 de Material e Métodos. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata biológica e técnica sendo que cada triplicata técnica consistiu de 3 plantas.

A Figura 28 mostra os resultados da quantificação do número de células de *A. brasilense* em trigo inoculado em condições estéreis utilizando os oligonucleotídeos Azo-2, (específico para *Azospirillum* sp) e os oligonucleotídeos AzoR2.1, AzoR2.2 e AzoR5.3 (específicos para a estirpe FP2). Não houve diferença estatística entre as quantificações utilizando os três oligonucleotídeos estirpe específicos e também entre o oligonucleotídeo espécie e estirpe específicos. É possível observar o elevado número de bactéria encontrado, já nos primeiros dias após a inoculação. Couillerot et al. (2010b) desenvolveram oligonucleotídeos para contagem de *A. brasilense* UAP-154 e CFN-535 por qPCR em milho e também observaram um elevado número

de bactérias tanto por qPCR quanto por contagem (10^5 a 10^7 UFC/raiz de milho) 1 a 3 dias após a inoculação.

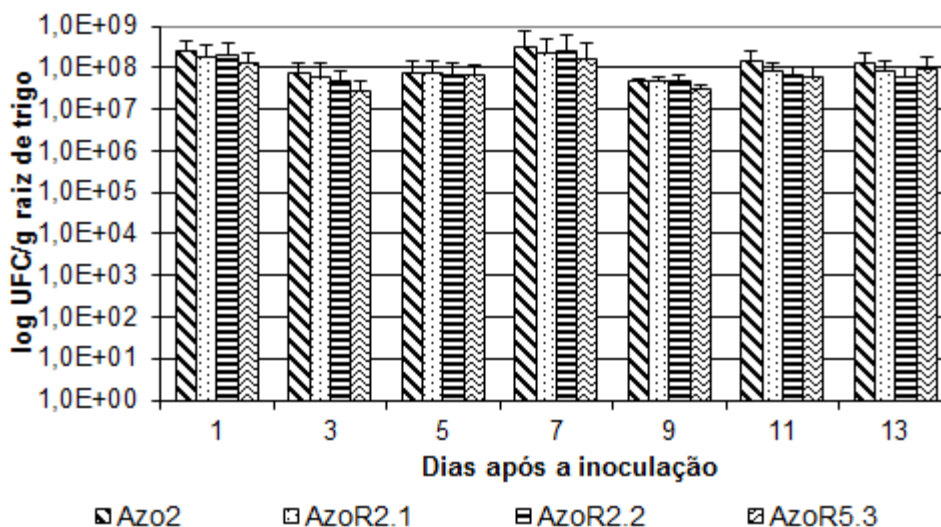


Figura 28 Quantificação de *A. brasilense* FP2 por qPCR em trigo inoculado em condições estéreis 1 a 13 dias após a inoculação. Foi utilizado o oligonucleotídeo Azo-2, específico para a espécie e os oligonucleotídeos AzoR2.1, AzoR2.2 e AzoR5.3, específicos para a estirpe FP2. Não houve diferença estatística entre os tratamentos (Anova, 95% de confiança).

A quantificação de *A. brasilense* FP2 também foi realizada por método tradicional de contagem em placa contendo meio NFbHPN. A comparação entre os resultados das duas técnicas é mostrada na Figura 29, não houve diferença estatística entre as metodologias utilizadas.

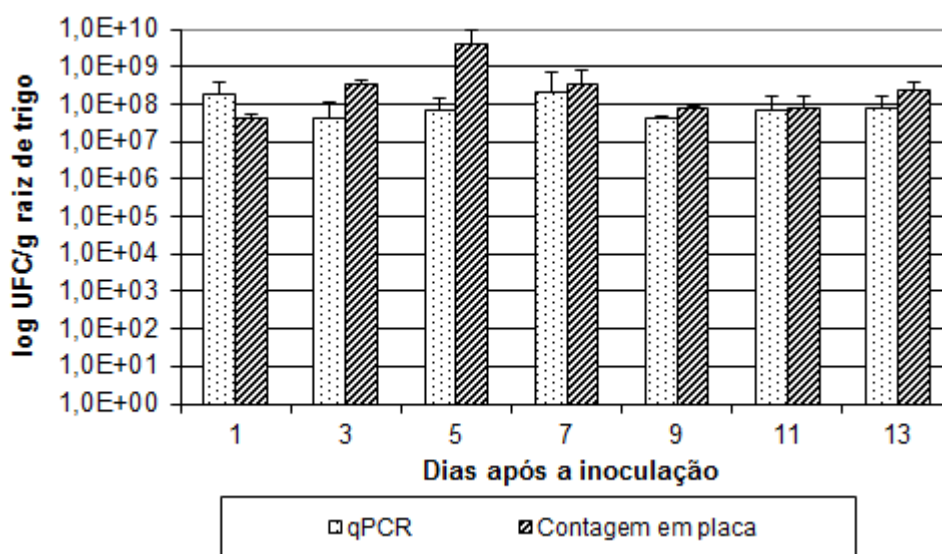


Figura 29 Comparação da quantificação de *A. brasilense* FP2 associado à raiz de trigo pelas técnicas de qPCR e contagem em placa em condições estéreis. Os valores para qPCR correspondem à média das quantificações pelos oligonucleotídeos estirpe específicos. Não houve diferença estatística entre as metodologias (Teste t pareado, 95 e 99% de confiança).

Foi também observado um aumento do peso fresco da raiz e parte aérea das plantas inoculadas (Figuras 30 e 31) com *A. brasilense* FP2. Este aumento foi mais evidente na raiz. A presença de auxinas está relacionada ao aumento do comprimento da raiz e do número de pêlos e raízes laterais e o fitormônio mais importante produzido por *Azospirillum* é a auxina ácido 3-indolacético (AIA) (DOBBELAERE et al., 2003).

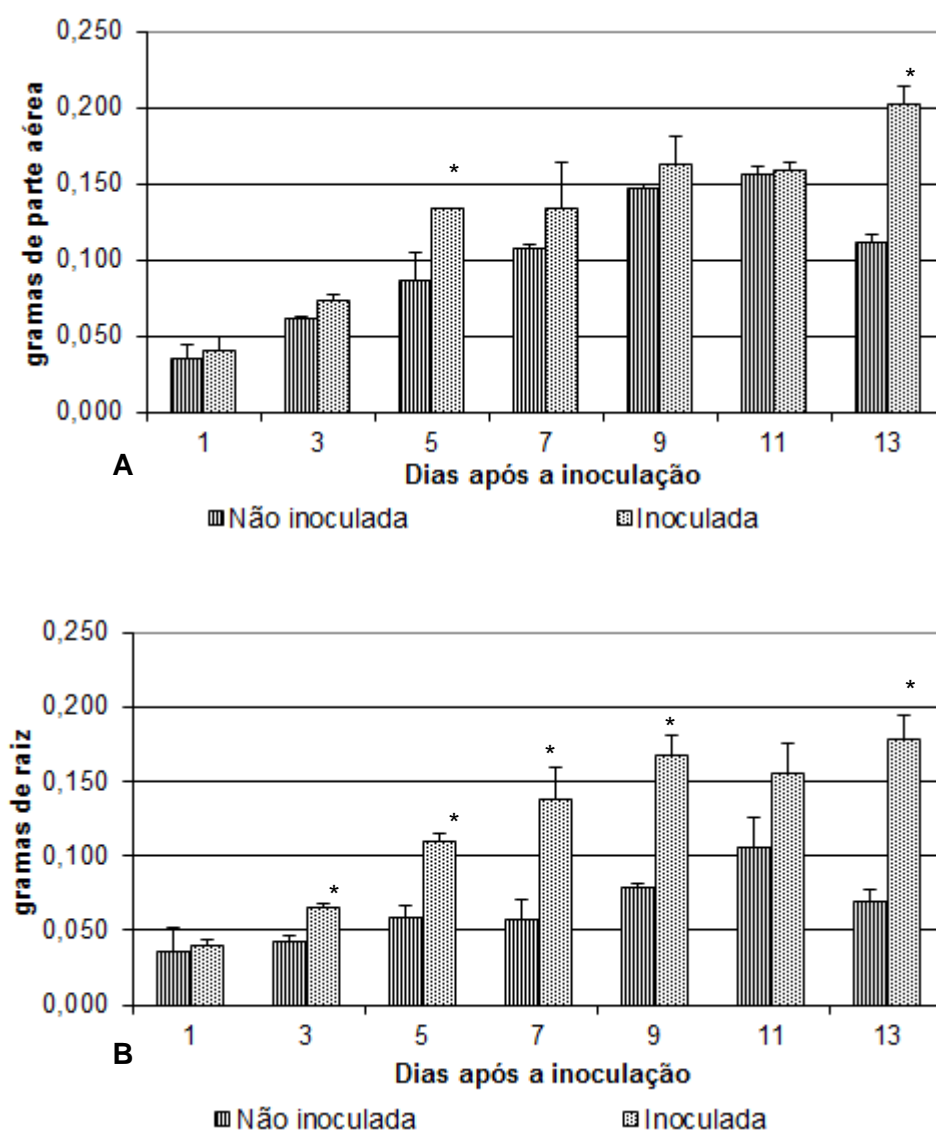


Figura 30 Efeito da inoculação de *A. brasilense* FP2 no peso fresco de raízes (A) e parte aérea (B) de pantas de trigo cultivadas sob condições estéreis 1 a 13 dias após a inoculação. Asteriscos indicam diferença estatística entre os tratamentos (Teste t pareado, 95% de confiança).

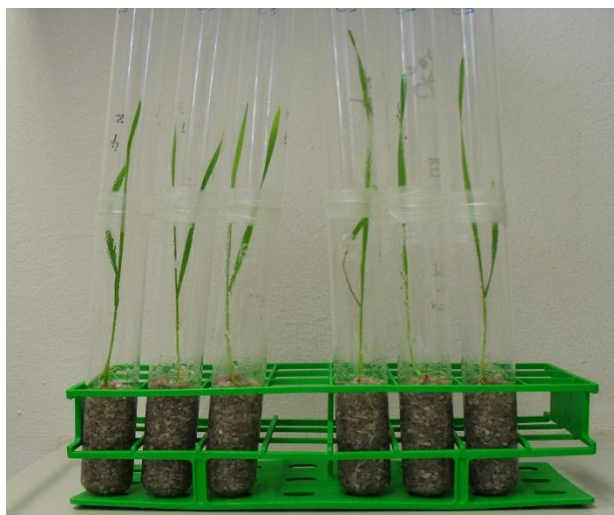


Figura 31 Promoção de crescimento de trigo inoculado com *A. brasilense* FP2.

15.3 Quantificação de *A. brasilense* FP2 associado a trigo cultivado sob condições não estéreis

Para a quantificação de *A. brasilense* FP2 em condições não estéreis em casa de vegetação, solo foi suspenso em meio Hoagland (1:10, p:v), filtrado e adicionado aos tubos contendo pérolas de sílica. As sementes foram desinfestadas, inoculadas com *A. brasilense* FP2, as plantas foram coletadas nos períodos indicados e o DNA extraído como nos experimentos anteriores.

Na Figura 32 estão mostrados os resultados da quantificação de *A. brasilense* FP2 utilizando qPCR com 4 diferentes oligonucleotídeos e por contagem em placa. Novamente, não houve diferença estatística no número de bactérias quando os diferentes oligonucleotídeos foram utilizados. Uma vez que o par Azo-2 é específico para o gênero *Azospirillum* e não houve um aumento no número de UFCs pela quantificação com este oligonucleotídeo, quando comparado com a quantificação pelos oligonucleotídeos estirpe específicos, os resultados mostram que não havia bactérias deste gênero no solo utilizado nestes experimentos.

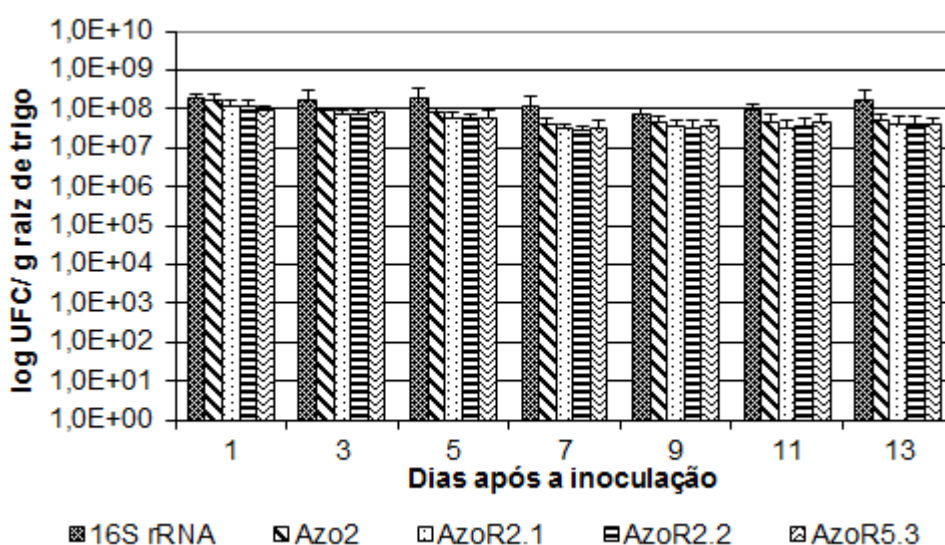


Figura 32 Quantificação de *A. brasilense* FP2 associado ao trigo em condições não estéreis 1 a 13 dias após a inoculação. Foi utilizado o oligonucleotídeo para o 16S rRNA, Azo-2, específico para a espécie e os oligonucleotídeos AzoR2.1, AzoR2.2 e AzoR5.3, específicos para a estirpe FP2. Não houve diferença estatística entre os tratamentos (Anova, 95% de confiança).

Quando se compara a contagem pelo método tradicional em placa e qPCR (Figura 33) observa-se que os resultados obtidos pelas duas técnicas foram muito similares.

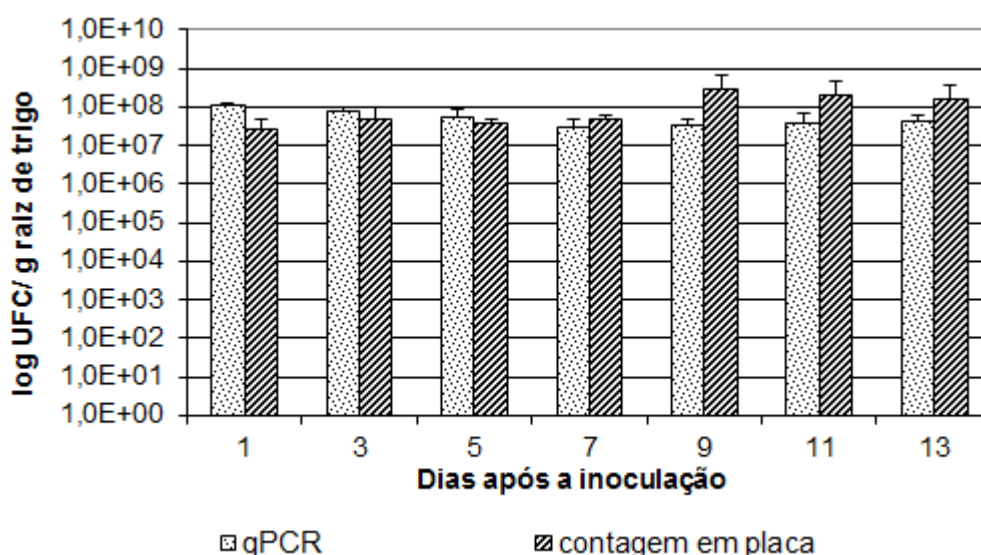


Figura 33 Comparação da quantificação de *A. brasilense* FP2 associado á raiz de trigo pelas técnicas de qPCR e contagem em placa em condições não estéreis. Os valores para qPCR correspondem à média das quantificações pelos oligonucleotídeos estirpe específicos. Não houve diferença estatística entre as metodologias (Teste t pareado, 95 e 99% de confiança).

15.4 Quantificação de *A. brasilense* FP2 associado a trigo cultivado sob condições não estéreis e na presença de outras bactérias diazotróficas

Estes experimentos foram conduzidos em condições não estéreis e *A. brasilense* FP2 foi co-inoculado com *A. brasilense* NH, *Herbaspirillum seropedicae* Z67, *Gluconacetobacter diazotrophicus* DSM 5601 e *A. lipoferum* DSM 1691, todos com concentração final de 10^7 UFC/planta, em casa de vegetação.

Não foi observado uma grande flutuação populacional de *A. brasilense* FP2, ficando a contagem estabilizada acima de 10^7 UFC/g de raiz de trigo. Não houve diferença estatística no número de *A. brasilense* FP2 quando os diferentes oligonucleotídeos foram utilizados (Figura 34) exceto na quantificação de bactérias totais de 1 a 7 dias após a inoculação. Quando os oligonucleotídeos específicos para a estirpe FP2 (AzoR2.1, AzoR2.2 e AzoR5.3), desenvolvidos neste trabalho, foram usados com DNA de plantas inoculadas com outras estirpes bacterianas nas condições não estéreis, não foi observado nenhum produto de amplificação confirmando a especificidade destes oligonucleotídeos para a detecção de *A. brasilense* FP2.

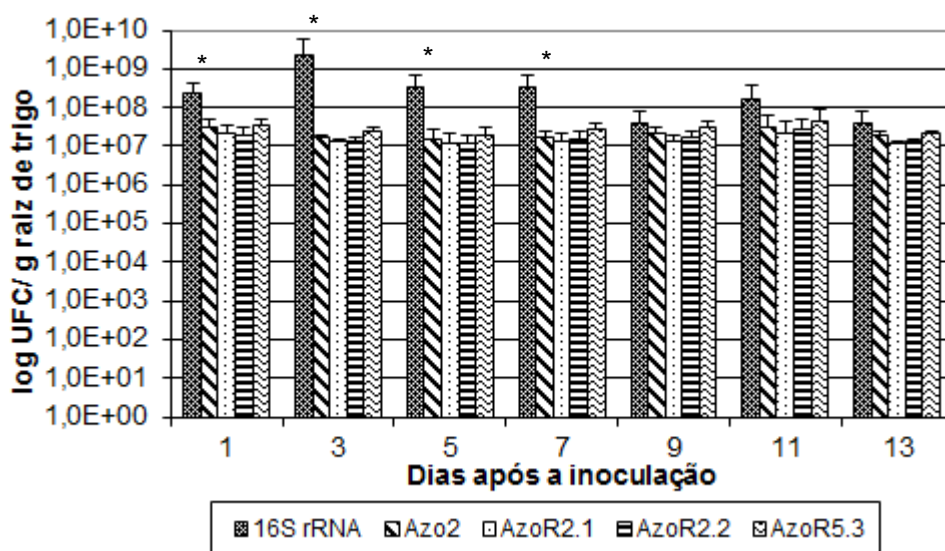


Figura 34 Quantificação de *A. brasilense* FP2 associado a trigo inoculado na presença de outras bactérias diazotróficas 1 a 13 dias após a inoculação. Foi utilizado o oligonucleotídeo para o 16S rRNA, Azo-2, específico para a espécie e os oligonucleotídeos AzoR2.1, AzoR2.2 e AzoR5.3, específicos para a estirpe FP2. Asteriscos indicam diferença estatística (Anova, 95% de confiança).

A comparação entre a contagem de *A. brasilense* FP2 pela técnica de qPCR e contagem em placa (Figura 35) mostrou novamente resultados similares aos encontrados em condições não estéreis.

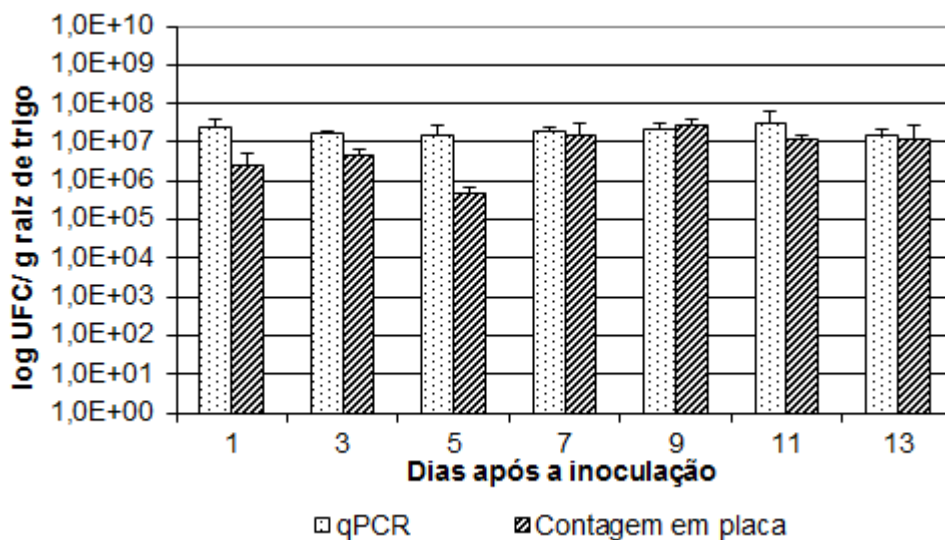


Figura 35 Comparação da quantificação de *A. brasilense* FP2 associado á raiz de trigo pelas técnicas de qPCR e contagem em placa na presença de outras bactérias diazotróficas. Os valores para qPCR correspondem á média das quantificações pelos oligonucleotídeos estirpe específicos. Não houve diferença estatística entre as metodologias (Teste t pareado, 95 e 99% de confiança).

A Figura 36 apresenta um resumo dos experimentos de quantificação de *A. brasilense* FP2 associado a raízes de trigo inoculado. O número de células de *A. brasilense* FP2 não ficou abaixo de 10^7 UCF/g de peso fresco de raiz indicando que esta bactéria é competitiva, mantendo uma alta contagem de células mesmo na presença de rizobactérias competidoras.

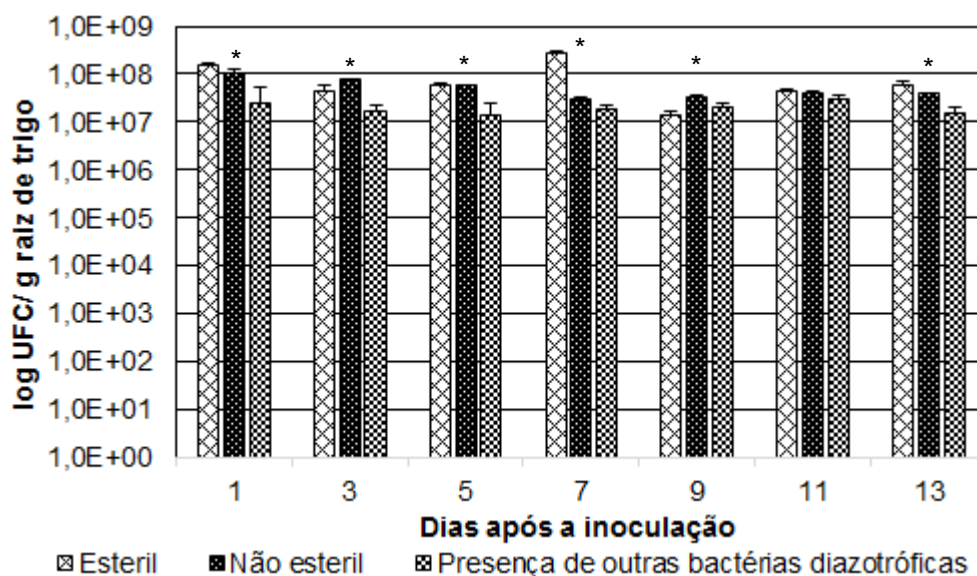


Figura 36 Resumo da quantificação por qPCR de *A. brasilense* FP2 inoculado em trigo nas três condições experimentais testadas neste trabalho. Os valores correspondem à média das quantificações pelos oligonucleotídeos estirpe específicos. Asteriscos indicam diferença estatística (Anova, 95% de confiança).

Os oligonucleotídeos e a metodologia de qPCR desenvolvida neste trabalho demonstraram ser ferramentas úteis no monitoramento da dinâmica da população da bactéria inoculada em trigo com potencial aplicação em experimentos no campo. Esta técnica também já foi utilizada com sucesso para quantificar outras bactérias associadas com plantas. O patógeno *Xylella fastidiosa* foi quantificado em plantas cítricas (OLIVEIRA et al., 2002) enquanto que a bactéria endofítica *Methylobacterium mesophilicum* foi monitorada por qPCR durante a colonização de *Catharanthus roseus* (LACAVA et al., 2006). Em *Brassica oleracea*, a população da bactéria promotora de crescimento vegetal *Enterobacter radicincitans* foi monitorado por qPCR associado com FISH (RUPPEL et al., 2006), determinando não somente a quantidade da bactérias nas plantas colonizadas mas também sua localização na planta.

16 CONCLUSÕES

Com os resultados deste capítulo pode-se concluir que:

- O oligonucleotídeo Azo-2 foi específico para *A. brasilense* e os oligonucleotídeos AzoR2.1, AzoR2.2, AzoR5.1, AzoR5.2 e AzoR5.3 foram específicos para a estirpe de *A. brasilense* FP2;
- Não foi observado uma grande flutuação populacional de *A. brasilense* FP2 em trigo nas condições testadas e a comparação entre a quantificação da bactéria inoculada por qPCR e contagem em placa mostrou resultados similares em todas as condições testadas;
- A metodologia de qPCR desenvolvida é uma ferramenta muito útil no monitoramento da dinâmica da população da bactéria inoculada com potencial aplicação no campo.

17 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO, E. et al. **Wheat growth and physiology**. In: CURTIS, B.C. et al. Bread wheat. Rome, Italy: FAO Plant Production and Protection Series (FAO), nº 30, 2002.
- ALM, R.; JOHANSSON, P.; HJERNØ, K.; EMANUELSSON, C.; RINGNÉR, M.; HÄKKINEN, J. Detection and identification of protein isoforms using cluster analysis of MALDI-MS mass spectra. **Journal of Proteome Research** v. 5, p. 785-792, 2006.
- AMANN, R. I., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification an *in situ* detection of individual cells without cultivation. **Microbial Reviews**, v. 59, n.1, p.143-169, 1995.
- AMANN, R., LUDWIG, W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology **FEMS Microbiology Reviews** v. 24, p. 555–565, 2000.
- ASSMUS, B., HUTZLER, P., KIRCHHOF, G., AMANN, R., LAWRENCE, J. R., HARTMANN, A. In-situ localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, ribosomal-RNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1013–19, 1995.
- ASSUMPÇÃO, L. C.; LACAVA, P. T.; FRANCO DIAS, A. C.; AZEVEDO, J. L.; MENTEN, J. O. M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa agropecuária brasileira** [online] vol. 44, n. 5, 2009.
- AZIZ, R. K., BARTELS, D., BEST, A. A., DEJONGH, M., DISZ, T., EDWARDS, R. A., FORMSMA, K., GERDES, S., GLASS, E. M., KUBAL, M., MEYER, F., OLSEN, G. J., OLSON, R., OSTERMAN, A. L., OVERBEEK, R. A., MCNEIL, L. K., PAARMANN, D., PACZIAN, T., PARRELLO, B., PUSCH, G. D., REICH, C., STEVENS, R., VASSIEVA, O., VONSTEIN, V., WILKE, A., ZAGNITKO, O. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. **BMC Genomics** v. 8, p. 9-75, 2008.
- BALDANI, J. I., BALDANI, V. L. D., SELDIN, L., DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root associated nitrogen fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology** v. 36, p. 86-93, 1986.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Annual Brazilian Academy of Sciences**, v. 77, p. 549–579, 2005.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L. V.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 29, p. 911-922, 1997.

BARRAQUIO, W. L.; REVILLA, L.; LADHA, J. K. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. **Plant and Soil**, v.194, p.15-24, 1997.

BASHAN, Y. Interactions of *Azospirillum* spp. in soils: a review. **Biology and Fertility of Soils** v. 29, p. 246–256, 1999.

BASHAN, Y., DE-BASHAN, L. E. Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology** v. 68, p. 2637–2643, 2002.

BASHAN, Y., HOLGUIN, G., DE-BASHAN, L. *Azospirillum*–plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). **Canadian Journal Microbiology** v. 50, p. 521–577, 2004.

BASHAN, Y., LEVANONY, H., WHITMOYER, R. E. Root surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic *Azospirillum brasilense*. **Journal of General Microbiology** v. 137, p. 187–196, 1991.

BASHAN, Y., PUENTE, M. E., RODRIGUEZ-MENDOZA, M. N., TOLEDO, G., HOLGUIN, G., FERRERA-CERRATO, R., PEDRIN, S. Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. **Applied Environmental Microbiology** v. 61, p. 1938–1945, 1995.

BAUDOIN, E.; NAZARET, S.; MOUGEL, C.; RANJARD, L.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. Impact of inoculation with the phytostimulatory PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1 on the genetic structure of the rhizobacterial community of field-grown maize. **Soil Biology & Biochemistry** v. 41, p. 409-41, 2009.

CANTU, M. D., CARRILHO, E., WULFF, N. A., PALMA, M. S. Peptide sequencing using mass spectrometry: a practical guide. **Química Nova** v.31, n.3, p. 669-675. 2008.

CASTRO-SOWINSKI, S., HERSCHKOVITZ, Y., OKON, Y., JURKEVITCH, E. Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. **FEMS Microbiology Letters** v. 276, p. 1–11, 2007.

CAVALLET, L. H.; PESSOA, A. C. S.; HELMICH, J. J.; HELMICH, P. R.; OST, C. F. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.4, n.1, p.129-132, 2000.

CLAYDON, M. A.; DAVEY, S. N.; EDWARDS-JONES, V.; GORDON, D. B. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. **Nature Biotechnology** v. 14, p. 1584-1586, 1996.

CONAB-Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, sétimo levantamento, abril 2011** – Brasília : Conab, 2011.

COUILLEROT, O., BOUFFAUD, M.L., BAUDOUIN, E., MULLER, D., CABALLERO-MELLADO, J. AND MOENNE-LOCCOZ, Y. Development of a Real-time PCR Method to Quantify the PGPR Strain *Azospirillum Lipoferum* CRT1 on Maize Seedlings. **Soil Biology & Biochemistry** v. 42, p. 2298-2305, 2010.

COUILLEROT, O., POIRIER, M. A., PRIGENT-COMBARET, C., MAVINGUI, P., CABALLERO-MELLADO, J. MOENNE-LOCCOZ, Y. Assessment of SCAR Markers to Design Real-time PCR Primers for Rhizosphere Quantification of *Azospirillum brasilense* Phytostimulatory Inoculants of Maize. **Journal of Applied Microbiology** v. 109, p. 528-538, 2010.

CREUS, C. M., GRAZIANO, M., CASANOVAS, E. M., PEREYRA, M. A., SIMONTACCHI, M., PUNTARULO, S., BARASSI, C. A., LAMATTINA, L. Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. **Planta** v. 221, p. 297–303, 2005.

DAIMS, H., BRÜHL, A., AMANN, R., SCHLEIFER, K.-H., WAGNER, M. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. **Systematic and Applied Microbiology** v. 22, p. 434–444, 1999.

DAIMS, H., NIELSEN, J. L., NIELSEN, P. H., SCHLEIFER, K. H., WAGNER, M. In situ characterization of nitrospira-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater

treatment plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.6, p. 5273–5284, 2001.

DEAKER, R.; ROUGHLEY, R. J.; KENNEDY, I. R. Desiccation tolerance of rhizobia when protected by synthetic polymers. **Soil Biology & Biochemistry** v.39, p.573-580, 2007.

DEMIREV, P. A.; FENSELAU, C. Mass Spectrometry for rapid characterization of microorganisms. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v.1, p.71–93, 2008.

DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A. in: U.Gerischer (Ed.), **Acinetobacter Molecular Biology**, Caister Academic Press, UK, 2008.

DOBBELAERE, S., CROONENBORGH, A., THYS, A., PTACEK, D., OKON, Y., VANDERLEYDEN, J. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils** v. 36, p. 284–297, 2002.

DOBBELAERE, S., VANDERLEYDEN, J., OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 2, p. 107 – 149, 2003.

DOBBELAERE, S.; OKON, Y. The plant growth-promoting effect and plant responses. In Elmerich C., Newton W.E. (eds.), **Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations**, Dordrecht: Springer, pp. 145-170, 2007.

DÖBEREINER, J. Forage grasses and grain crops. In: BERGENSEN, F.J. (Ed.). **Methods for evaluating biological nitrogen fixation**. New York: John Wiley & Sons, p. 535-555, 1980.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. de O.; BALDANI, V. L. D. **Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília: EMBRAPA, SPI; Itaguaí: EMBRAPA, CNPAB, 1995. 60p.

DOBRITSA, A. P., REDDY, M. C. S., SAMADPOUR, M. Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttiense*, with

the description of *H. huttiense* subsp. *huttiense* subsp. nov. and *H. huttiense* subsp. *putei* subsp. nov., comb. nov., and description of *Herbaspirillum aquaticum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** v. 60, p. 1418-1426, 2010.

DRESCHER, M. M., BALDANI, V. L. D. Métodos de desinfestação superficial para obtenção de sementes de milho livres de microrganismos. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 16 p., 2006 (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 212).

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Disponível em <http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo/index.htm>, 2005.

ENGERLHARD, M.; HUREK, T.; REINHOLD HUREK, B. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. **Environmental Microbiology**, v.2, p.131-141, 2000.

EVASON, D. J.; CLAYDON, M. A.; GORDON, D. B. Exploring the Limits of Bacterial Identification by Intact Cell-Mass Spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry** v. 12, p. 49–54, 2001.

FADERL, S., HOCHHAUS, A., HUGHES, M. D. Monitoring of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America** v. 18, p. 657-70, 2004.

GHOLAMI, A., SHAHSAVANI, S., NEZARAT, S. The effect of plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. **World Academy of Science, Engineering and Technology** v. 49 p. 19-24, 2009.

HARTMANN, A., BALDANI, J. I. The genus *Azospirillum*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (eds) **The prokaryotes**. Wiley, New York, p. 114–140, 2003.

HOLLAND, R. D.; WILKES, J. G.; RAFII, F.; SUTHERLAND, J. B.; PERSONS, C. C.; VOORHEES, K. J.; et al. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionisation with time of flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry** v. 10, p. 1227-1232, 1996.

- HSIEH, S. Y., TSENG, C. L., LEE, Y. S., KUO, A. J., SUN, C. F., LIN, Y. H., CHEN, J. K. Highly Efficient Classification and Identification of Human Pathogenic Bacteria by MALDI-TOF MS. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 7.2, p. 448-456, 2008.
- HUNGRIA, M., CAMPO, R. J., SOUZA, E. M., PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, p. 413-425, 2010.
- JAMES, E. K.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Infection of sugar cane by nitrogen fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany** v. 45 p. 757-766. 1994.
- JHA, B., THAKUR, M. C., GONTIA, I., ALBRECHT, V., STOFFELS, M., SCHMID, M., HARTMANN, A. Isolation, partial identification and application of diazotrophic rhizobacteria from traditional Indian rice cultivars. **European journal of soil biology** v. 45, p. 62-72, 2009.
- JOHANSSON, P. M.; JOHANSSON, L.; GERHARDSON, B. Suppression of wheat-seedling diseases caused by *Fusarium culmorum* and *Microdochium nivale* using bacterial seed treatment. **Plant Pathology** v. 52, p. 219-227, 2003.
- KARAS, M.; BACHMANN, D.; BAHR, U.; HILLENKAMP, F. Matrix-assisted ultraviolet Laser desorption of non-volatile compounds. **International Journal of Mass Spectrometry** v. 78, p. 53-68, 1987.
- KARAS, M.; HILLENKAMP, F. LASER desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Analytical Chemistry** v. 60, p. 2299-2301, 1988.
- KARI, E. D.; GERMIDA, J. J. Diversity of bacterial communities in the rhizosphere and root interior of field-grown genetically modified *Brassica napus*. **FEMS Microbiology Ecology** v. 38, p. 1-9, (2001).
- KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology** v. 27, p. 137-138, 1965.
- KEYS, C. J.; DARE, D. J.; SUTTON, H.; WELLS, G.; LUNT, M.; MCKENNA, T.; McDOWALL, M.; SHAH, H. N. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. **Infection, Genetics and Evolution** v. 4, p. 221-242, 2004.

- KHAN, M. R.; FISCHER, S.; EGAN, D.; DOOHAN, F. M. Biological control of *Fusarium* seedling blight disease of wheat and barley. **Phytopathology** v. 96, p. 386-394, 2006.
- KLOEPPER, J. W., SCHROTH, M. N., MILLER, T. D. Effects of Rhizosphere Colonization by Plant Growth Promotion Rhizobacteria on Potato Plant Development and Yield. **Phytopathology** v. 70, p. 1078-1082, 1980.
- KUKLINSKY-SOBRAI, J., ARAUJO, W. L., MENDES, R., GERALDI, I. O., PIZZIRANI-KLEINER, A. A., AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1244-1251, 2004.
- LACAVA, P. T., LI, W. B., ARAUJO, W. L., AZEVEDO, J. L.; HARTUNG, J. S. Rapid, specific and quantitative assays for the detection of the endophytic bacterium *Methylobacterium mesophilicum* in plants. **Journal of Microbiological Methods** v. 65, p. 535-541, 2006.
- LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. /In /STACKEBRANDT, E., GOODFELLOW. M. (Eds.). **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics** p. 115–148, 1991.
- LAY JR, J. O. MALDI-TOF mass spectrometry and bacterial taxonomy. **Trends in analytical chemistry**, v. 19, n. 8, 2000.
- LEE, S. Indole-3 acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis gene. **Journal Bacteriology** v. 186, p. 5384-5391, 2004.
- LIU, H.; DU, Z.; WANG, J.; YANG, R. Universal sample preparation method for characterization of bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **Applied and Environmental Microbiology** p. 1899-1907, 2007.
- MA, H., SHIEH, K.J., CHEN, G, QIAO, T., CHUANG, M.Y. Application of Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). **The Journal of American Science** v. 2, p. 1-15, 2006
- MACHADO, H. B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 549-553, 1991.

- MARTINEZ-TOLEDO, M. V., GONZALEZ-LOPEZ, J. Effect of metolachlor on *Azotobacter* nitrogen fixation in soil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 8, p. 789–792, 1989.
- MAGNANI, G. **Diversidade de bactérias endofíticas em cana-de-açúcar**. Curitiba, 2005, 92 p. Dissertação (Ciências – Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná.
- MAUCHLINE, T. H., KERRY, B. R., HIRSCH, P. R. Quantification in soil and the rhizosphere of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* by competitive PCR and comparison with selective plating. **Applied Environmental Microbiology** v. 68, p. 1846–1853, 2002.
- MAVRODI, O. V., MAVRODI, D. V., THOMASHOW, L. S., WELLER, D. M. Quantification of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* strains in the plant rhizosphere by real-time PCR. **Applied Environmental Microbiology** v. 73, p. 5531–5538, 2007.
- MOTER, A. GÖBEL, U. B. Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. **Journal of Microbiological Methods** v.41, p. 85-112. 2000.
- NAIMAN, A. D., LATRÓNICO, A., SALAMONE, I. E. G. Inoculation of wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact on the production and culturable rhizosphere microflora. **European Journal of Soil Biology** v. 45, p. 44-51, 2009.
- NARULA, N., DEUBEL, A., GANS, W., BEHL, R. K., MERBACH, W. Paronodules and colonization of wheat roots by phytohormone producing bacteria in soil. **Plant Soil Environmental** v. 52, p. 119-129, 2006.
- OLIVEIRA, A. L. M., STOFFELS, M., SCHMID, M., REIS, V. M., BALDANI, J. I., HARTMANN, A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 106-113, 2009.
- OLIVEIRA, A. C., VALLIM, M. A., SEMIGHINI, C. P., ARAUJO, W. L., GOLDMAN, G. H., MACHADO, M. A. Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by real-time polymerase chain reaction assay. **Phytopathology** v. 92, p. 1048-1054, 2002.
- PEDRAZA, R. O.; BELLONE, C. H.; BELLONE, S. C.; BOA SORTE, P. M. F.; TEIXEIRA, K.R. S. *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilization effect on grain

yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. **European Journal of Soil Biology** v. 45, p. 36-43, 2009.

PEDROSA, F. O.; YATES, M. G. Regulation of nitrogen fixation (nif) genes of *Azospirillum brasilense* by nifA and ntr (gln) type gene products. **FEMS Microbiology Letters** v. 23, p. 95-101, 1984.

PEIX, A.; LANG, E.; VERBARG, S.; SPROËR, C.; RIVAS, R.; SANTA-REGINA, I.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; RODRÍGUEZ-BARRUECO, C.; VELÁZQUEZ, E. *Acinetobacter* strains IH9 and OCI1, two rhizospheric phosphate solubilizing isolates able to promote plant growth, constitute a new genomovar of *Acinetobacter calcoaceticus*. **Systematic and Applied Microbiology** v. 32, p. 334-341, 2009.

POLIDORO, J. C.; RESENDE, A. S. DE; QUESADA, D. M.; XAVIER, R. P.; COELHO, C. H. M.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Levantamento da contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a cultura da cana-de-açúcar no Brasil. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Embrapa Agrobiologia, Seropédica – RJ, n. 144, ISSN1517-8498, 2001.

RAJAKARUNA, L.; HALLAS, G.; MOLENAAR, L.; DARE, D.; SUTTON, H.; ENCHEVA, V.; CULAK, R.; INNES, I.; BALL, G.; SEFTON, A. M.; EYDMANN, M.; KEARNS, A. M.; SHAH, H. N. High throughput identification of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* using MALDI-TOF-MS of intact cells. **Infection, Genetics and Evolution** v. 9, p. 507-513, 2009.

RAMOS, H. J. O., RONCATO-MACCARI, L. D. B., SOUZA, E. M., SOARES-RAMOS, J. R. L., HUNGRIA, M., PEDROSA, F. O. Monitoring *Azospirillum*-wheat interactions using the gfp and gusA genes constitutively expressed from a new broadhost range vector. **Journal of Biotechnology**, v. 97, p. 243–252, 2002.

RODRIGUES, L. S.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v. 41, n. 2, p. 275-284, 2006.

ROMEIRO, R.S. **Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em suspensão. Laboratório de bacteriologia de plantas.** Viçosa: UFV.

Disponível em:< <http://dc451.4shared.com/doc/Oy2uUTUh/preview.html> >. Acesso em: 18 nov. 2012.

RONCATO-MACCARI, L. D. B.; RAMOS, H. J. O.; PEDROSA, F. O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L. S.; YATES, M. G.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 45, p. 39-47, 2003.

ROSADO, A. S., SELDIN, L., WOLTERS, A. C., VAN ELSAS, J. D. Quantitative 16S rDNA-targeted polymerase chain reaction and oligonucleotide hybridization for the detection of *Paenibacillus azotofixans* in soil and the wheat rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology** v. 19, p. 153–164, 1996.

ROTHBALLER, M., SCHMID, M., HARTMANN, A. In situ localization and PGPR-effect of *Azospirillum brasilense* strains colonizing roots of different wheat varieties, *Symbiosis* v. 34, p. 261–279, 2003.

ROTHBALLER, M., SCHMID, M., KLEIN, I., GATTINGER, A., GRUNDMANN, S. HARTMANN, A. *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** v. 56, p. 1341-1348, 2006.

RUPPEL, S., RUHLMANN, J., MERBACH, W. Quantification and localization of bacteria in plant tissues using quantitative real-time PCR and online emission fingerprinting. **Plant Soil** v. 286, p. 21-35, 2006.

RUTHERFORD, K., PARKHILL, J., CROOK, J., HORSNELL, T., RICE, P., RAJANDREAM, M. A., BARRELL, B. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics**. v.16, p. 944-945, 2000.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution** v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SCHINNER, F.; ÖHLINGER, R.; KANDELER, E., MARGESIN, R. **Bodenbiologische Arbeitsmethoden**. 2.ed. Berlin, Springer-Verlag, p. 389, 1993.

SAMBROOK, J. P; FRITSCH, E. F; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAUER, S., FREIWALD, A., MAIER, T., KUBE, M., REINHARDT, R., KOSTRZEWA, M., GEIDER, K. Classification and Identification of Bacteria by Mass Spectrometry and Computational Analysis. **PLoS ONE**. v. 3, p.1-10, 2008.

SAXENA, B., MODI, M., MODI, V. V. Isolation and Characterization of Siderophores from *Azospirillum lipoferum* D-2. **Journal of General Microbiology** v. 132, p. 2219-2224, 1986.

SCHÄFER, A., TAUCH, A., JÄGER, W., KALINOWSKI, J., THIERBACH, G., PÜHLER, A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. **Gene** v. 145, p. 69-73, 1994.

SESHADRI, S., MUTHUKUMARASAMY, R., LAKSHINARASIMHAN, C., IGNACIMUTHU, S. Solubilization of inorganic phosphates by *Azospirillum halopraeferans*. **Current Science** v. 79, p. 565–567, 2000.

SLAFER, G. A.; RAWSON, H. M. Sensitivity of wheat phasic development to major environmental factors: A re-examination of some assumptions made by physiologists and modellers. **Australian Journal of Plant Physiology** v. 21, p. 393-426, 1994.

SON, H.; PARK, G.; CHA, M.; HEO, M. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. **Bioresource Technology** v. 97, p. 204-210, 2006.

SOUZA, E. M., PEDROSA, F. O., RIGO, L. U., MACHADO, H. B., YATES, M. G. Expression of the *nifA* gene of *Herbaspirillum seropedicae*: role of the NtrC and NifA binding sites and of the -24/-12 promoter element. **Microbiology**, v. 146, p. 1407-1418, 2000.

SØRENSEN, J., NICOLAISEN, M. H., RON, E., SIMONET, P. Molecular tools in rhizosphere microbiology—from single-cell to whole-community analysis. **Plant and Soil** v. 321, p. 483-512, 2009.

STEENHOUDT, O., VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews** v. 24, p. 487-506, 2000.

STOFFELS, M., CASTELLANOS, T., HARTMANN, A. Design and application of new 16SrRNA-targeted oligonucleotide probes for the *Azospirillum–Skermanella–Rhodocista*-cluster. **Systematic and Applied Microbiology** v. 24, p. 83–97, 2001.

SUMAN, A., SHASANY, A. K., SINGH, M., SHAHI, H. N., GAUR, A., KHANUJA, S. P. S. Molecular assessment of diversity among endophytic diazotrophs isolated from subtropical Indian sugarcane. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** v. 17, p.39-45, 2001.

TANAKA, K. ; WAKI, H. ; IDO, Y. ; AKITA, S. ; YOSHIDA, Y. ; YOSHIDA, T. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry** v. 2, p. 151-153, 1988.

THULER, D., FLOSH, E., HANDRO, W., BARBOSA, M. Plant growth regulators and amino acids released by *Azospirillum* sp. in chemically defined medium. **Letters Applied Microbiology** v. 37, p. 174–178, 2003.

TIEN, T. M., GASKINS, M. H., HUBBELL, D. H. Plant Growth Substances Produced by *Azospirillum brasilense* and Their Effect on the Growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.) **Applied and Environmental Microbiology** v. 37, p. 1016-1024, 1979.

USDA - **UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, Foreign Agricultural Service**. Production, Supply and Distribution Online: Custom Query. USA, 2009.

VALENTINE, N.; WUNSCHHEL, S.; WUNSCHHEL, D.; PETERSEN, C.; WAHL, K. Effect of culture conditions on microorganism identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. **Applied and Environmental Microbiology** p. 58-64, 2005.

VELINENI, S., BRAHMAPRAKASH, G. P. Survival and Phosphate Solubilizing Ability of *Bacillus megaterium* in Liquid Inoculants under High Temperature and Desiccation Stress. **Journal of Agricultural Science and Technology** v. 13, p. 795-802, 2011.

WILLIAMS, T. L.; ANDRZEJEWSKI, D.; LAY JR., J. O.; MUSSER, S. M. Experimental factors affecting the quality and reproducibility of MALDI TOF mass

spectra obtained from whole bacteria cells. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry** v. 14, p. 342-351, 2003.

WUNSCHHEL, S. C.; JARMAN, K. H.; PETERSEN, C. E.; VALENTINE, N. B.; WAHL, K. L.; SCHAUKI, D.; JACKMAN, J.; NELSON, C. P.; EDWARD WHITE, V. Bacterial Analysis by MALDI-TOF Mass Spectrometry: An Inter-Laboratory Comparison. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry** v. 16, p. 456-462, 2005.

ZAKHAROVA, E. A. Biosynthesis of indole-3acetic acid in *Azospirillum brasilense*. Insights from quantum chemistry. **European Journal of Biochemistry** v. 259, p. 572-576, 1999.